

Martyna Pękała

**Rola lipokaliny 2 w mysim modelu zaburzeń neurorozwojowych
wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki**

Praca doktorska

wykonana w Pracowni Neurobiologii

Instytutu Biologii Doświadczalnej

im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:

dr hab. Katarzyna Kalita-Bykowska,

prof. Instytutu Nenckiego PAN

Warszawa, 2024

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania dr hab. Katarzynie Kalicie-Bykowskiej za możliwość rozwoju naukowego, wyrozumiałość, cenne wskazówki oraz nieocenione wsparcie na każdym etapie realizacji pracy doktorskiej.

Dziękuję również prof. dr hab. Leszkowi Kaczmarkowi za możliwość wykonania pracy doktorskiej w Pracowni Neurobiologii oraz stworzenie inspirującego środowiska naukowego.

Wyrażam także wdzięczność koleżankom i kolegom z Pracowni Neurobiologii za okazaną życzliwość i pomoc w codziennych wyzwaniach badawczych.

Serdecznie dziękuję rodzinie, przyjaciołom, najbliższym - Wasze ogromne wsparcie było dla mnie bezcennym źródłem siły i motywacji podczas całego okresu studiów doktoranckich.

Badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki - grant OPUS 2017/27/B/NZ4/01639 przyznany dr hab. Katarzynie Kalicie Bykowskiej, prof. Instytutu Nenckiego PAN.



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Spis treści

Streszczenie	8
Abstract	10
Wykaz najczęściej stosowanych skrótów	12
1. Wstęp	14
1.1. Najważniejsze etapy rozwoju mózgu u ludzi	14
1.2. Przebieg rozwoju mózgu u myszy.....	16
1.3. Zaburzenia neurorozwojowe.....	17
1.4. Aktywacja układu odpornościowego matki w ciąży jako czynnik ryzyka wystąpienia zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa – dowody z badań epidemiologicznych.....	20
1.5. Aktywacja układu odpornościowego matki w ciąży jako czynnik ryzyka wystąpienia zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa - modele zwierzęce.....	21
1.5.1. Przegląd zwierzęcych modeli MIA	21
1.5.2. Wpływ MIA na zachowanie zwierząt.....	22
1.5.3. Zmiany anatomiczne w mózgu obserwowane w zwierzęcych modelach MIA.....	25
1.5.4. Wpływ MIA na strukturę i funkcję synaps oraz podstawowe właściwości elektrofizjologiczne neuronów	26
1.5.5. Prawdopodobne mechanizmy leżące u podstaw zaburzeń rozwojowych wywołanych przez MIA.....	32
1.5.5.1. Cytokiny	33
1.5.5.2. Mikroglej.....	35
1.5.5.3. Astrocyty.....	36
1.6. Lipokalina 2.....	38
1.6.1. Budowa Lcn2	39
1.6.2. Ligandy dla Lcn2	40
1.6.3. Receptory dla Lcn2	41
1.6.4. Lcn2 w OUN	43
1.6.4.1. Funkcje Lcn2 w OUN związane z odpowiedzią odpornościową	44
1.6.4.2. Rola Lcn2 w regulacji morfologii i funkcji neuronów oraz modulowaniu zachowania	48
1.6.5. Lcn2 a zaburzenia neurorozwojowe	49
2. Cele pracy	52
3. Materiały i metody	53
3.1. Zwierzęta	53
3.2. Genotypowanie myszy	53
3.3. Model aktywacji układu odpornościowego matki	54

3.4. Przygotowanie tkanki mózgowej do analizy ekspresji genów	55
3.5. Izolacja RNA	55
3.6. Odwrotna transkrypcja i ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)	56
3.7. Pomiary elektrofizjologiczne na skrawkach mózgu myszy	56
3.7.1. Przygotowanie skrawków mózgu.....	56
3.7.2. Rejestracja pobudliwości własnej neuronów pola CA1 hipokampa techniką <i>whole-cell patch-clamp</i>	57
3.8. Badanie kształtu i gęstości kolców dendrytycznych	58
3.8.1. Przygotowanie mikrocząstek wolframowych pokrytych barwnikiem Dil	58
3.8.2. Przygotowanie skrawków tkanki mózgowej oraz barwienie kolców dendrytycznych	58
3.8.3. Obrazowanie mikroskopowe kolców dendrytycznych	59
3.8.4. Analiza kształtu i gęstości kolców dendrytycznych	59
3.9. Badania behawioralne	60
3.9.1. Badanie zachowań społecznych w klatkach EcoHAB	60
3.9.1.1. System Eco-HAB	60
3.9.1.2. Przebieg eksperymentu w systemie Eco-HAB.....	61
3.9.1.3. Mierzone zachowania i algorytmy przetwarzania danych.....	62
3.9.2. Test zakopywania kulek	63
3.9.3. Test podwyższonego labiryntu krzyżowego.....	64
3.9.4. Trening apetytywny w klatce IntelliCage	65
3.9.4.1. System IntelliCage	65
3.9.4.2. Trening apetytywny rozróżniania położenia butelek zawierających wodę lub roztwór cukru w klatce IntelliCage	66
3.9.5. Test trójkomorowy.....	66
3.10. Analiza statystyczna	67
4. Wyniki	69
4.1. Analiza ekspresji mRNA <i>Lcn2</i> w trakcie rozwoju mózgu	69
4.2. Charakterystyka zwierzęcego modelu aktywacji układu odpornościowego matki (MIA) ..	70
4.2.1. Wpływ MIA na przyrost masy ciała ciężarnych samic oraz przeżywalność płodów	70
4.2.2. Wpływ MIA na ekspresję mRNA <i>Lcn2</i> w mózgu w rozwoju prenatalnym	72
4.3. Wpływ MIA i delecji genu <i>Lcn2</i> na odpowiedź zapalną w mózgu, funkcję i morfologię neuronów hipokampa oraz zachowanie zwierząt	74
4.3.1. Wpływ MIA i delecji genu <i>Lcn2</i> na ekspresję mRNA cytokin prozapalnych w łożysku oraz w mózgu potomstwa E18.....	75
4.3.2. Wpływ MIA i delecji genu <i>Lcn2</i> na właściwości elektrofizjologiczne neuronów pola CA1 hipokampa	81

4.3.2.1. Analiza pobudliwości własnej neuronów	81
4.3.2.2. Analiza parametrów potencjałów czynnościowych oraz podstawowych parametrów elektrofizjologicznych	83
4.3.3. Wpływ MIA i delecji genu <i>Lcn2</i> na gęstość i morfologię kolców dendrytycznych neuronów piramidowych pola CA1 hipokampa	86
4.3.4. Wpływ MIA i delecji genu <i>Lcn2</i> na zachowanie zwierząt	89
4.3.4.1. Zachowania społeczne.....	90
4.3.4.1.1. Ocena zachowań społecznych myszy w klatkach Eco-HAB	90
4.3.4.1.2. Ocena zachowań społecznych myszy w teście trójkomorowym	96
4.3.4.2. Analiza zachowania myszy w teście zakopywania kulek	98
4.3.4.3. Analiza zachowania myszy w teście podwyższonego labiryntu krzyżowego	99
4.3.4.4. Analiza zachowania myszy podczas treningu apetytywnego w klatce IntelliCage	102
5. Dyskusja.....	109
5.1. Model badawczy MIA	109
5.2. <i>Lcn2</i> ulega ekspresji w mózgu myszy już w rozwoju prenatalnym, a poziom mRNA <i>Lcn2</i> w mózgu płodu rośnie pod wpływem aktywacji układu odpornościowego matki	110
5.3. MIA indukuje ekspresję cytokin prozapalnych w łożysku i mózgu płodów, a efekty te są zależne od genotypu i płci potomstwa.....	112
5.4. Aktywacja układu odpornościowego matki w rozwoju prenatalnym i delecja genu <i>Lcn2</i> wpływają na podstawowe właściwości elektrofizjologiczne neuronów glutaminergicznych hipokampa dorosłych myszy, a efekt ten jest zależny od płci.....	114
5.5. MIA i delecja genu <i>Lcn2</i> wpływają na gęstość i morfologię kolców dendrytycznych neuronów piramidowych hipokampa dorosłych myszy, a efekt jest zależny od płci	116
5.6. MIA i delecja genu <i>Lcn2</i> powodują wystąpienie deficytów behawioralnych przypominających objawy zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa, jednak brak <i>Lcn2</i> w modelu infekcji prenatalnej nie wpływa na zachowanie zwierząt.....	119
5.6.1. Zachowania społeczne.....	119
5.6.2. Zachowania powtarzalne.....	121
5.6.3. Zachowania lękowe	121
5.6.4. Zaburzenia kognitywne	123
5.7. Prawdopodobne przyczyny deficytów obserwowanych u zwierząt z delecją genu <i>Lcn2</i> ..	124
5.8. Efekty aktywacji układu odpornościowego matki i delecji genu <i>Lcn2</i> są determinowane przez płeć potomstwa	127
6. Podsumowanie i wnioski	129
7. Bibliografia.....	130
8. Spis publikacji własnych	168

Streszczenie

Czynniki środowiskowe oddziałujące na mózg w okresie prenatalnym mogą zakłócać formowanie się połączeń nerwowych i tym samym zwiększać ryzyko zaburzeń neurorozwojowych (ang. *neurodevelopmental disorders*, NDDs). Coraz więcej badań epidemiologicznych wskazuje, że jednym z tych czynników jest infekcja w ciąży, jednak mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska wciąż pozostają niewyjaśnione. Dowody z badań na modelach zwierzęcych wskazują, że aktywacja układu odpornościowego matki (ang. *maternal immune activation*, MIA) jest kluczowa dla wystąpienia deficytów rozwojowych u potomstwa. Zidentyfikowanie białek zaangażowanych w te procesy jest niezbędne dla lepszego zrozumienia patogenezy NDDs oraz potencjalnego opracowania strategii profilaktycznych czy terapeutycznych.

Lipokalina 2 (*Lcn2*) to białko związane z wrodzoną odpowiedzią odpornościową, które wydzielane pod wpływem infekcji hamuje wzrost bakterii poprzez sekwestrację żelaza. Ekspresja *Lcn2* jest silnie indukowana w mózgu w odpowiedzi na stan zapalny, a profil jej działania może być zarówno przeciwzapalny, jak i nasilający procesy patologiczne. Co istotne, zarówno badania *in vivo* jak i *in vitro* wskazują, że białko to może wpływać na morfologię i funkcjonowanie komórek nerwowych i gleju. U dorosłych myszy z delecją genu *Lcn2* obserwowano nieprawidłowości struktury drzewa dendrytycznego i kolców dendrytycznych oraz zaburzenia funkcji komórek nerwowych. Ponadto, zwierzęta te wykazywały zachowania lękowe, depresyjne oraz deficyty uczenia się przestrzennego. Funkcje jakie pełni *Lcn2* w rozwijającym się mózgu nie zostały jednak dotąd zbadane.

Głównym celem niniejszej pracy było określenie roli białka *Lcn2* w procesach leżących u podstaw zaburzeń rozwoju mózgu myszy wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki. Wykorzystano model infekcji bakteryjnej, w którym ciężarne samice otrzymywały dootrzewnowe iniekcje lipopolisacharydu (LPS), będącego endotoksyną bakteryjną, wywołującą nieswoistą odpowiedź odpornościową. W pierwszej kolejności wykazano, że *Lcn2* ulega ekspresji w rozwijającym się mózgu, a MIA powoduje wzrost poziomu mRNA *Lcn2* w mózgu płodów obu płci. Aby ocenić czy obserwowane zmiany ekspresji *Lcn2* mają znaczenie dla wystąpienia zaburzeń rozwojowych, przeprowadzono badania z udziałem zwierząt transgenicznych – ciężarne samice o genotypie *Lcn2* Het poddano procedurze MIA, a potomstwo o genotypie niezmienionym

oraz z delecją genu *Lcn2* wykorzystano do dalszych doświadczeń. Wykazano, że aktywacja układu odpornościowego matki indukuje zależną od płci potomstwa ekspresję cytokin prozapalnych w łożysku i mózgu płodów, a brak *Lcn2* modyfikuje przebieg odpowiedzi zapalnej. U myszy o genotypie prawidłowym MIA powodowała zmiany gęstości i kształtu kolców dendrytycznych oraz pobudliwości komórek piramidowych hipokampa, czemu towarzyszyły deficyty behawioralne, przypominające objawy zaburzeń neurorozwojowych. Co ciekawe, delecja genu *Lcn2* w warunkach kontrolnych spowodowała podobne do występujących u potomstwa MIA zaburzenia zachowania. Efekty MIA i wyciszenia genu *Lcn2* były zależne od płci potomstwa. Nie zaobserwowano jednak istotnego wpływu delecji *Lcn2* na zachowanie zwierząt, których matki w ciąży otrzymywały iniekcje LPS. Uzyskane wyniki nie pozwalają jednoznacznie określić roli *Lcn2* w rozwoju zaburzeń wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki, ponieważ samo wyciszenie genu *Lcn2* prowadzi do analogicznych deficytów behawioralnych. Rezultaty tych badań podkreślają jednak istotne znaczenie tego białka dla prawidłowego rozwoju mózgu w warunkach fizjologicznych.

Abstract

Environmental factors affecting the brain during the prenatal period can disrupt the formation of neural connections, thereby increasing the risk of neurodevelopmental disorders (NDDs). A growing body of epidemiological evidence identifies infection during pregnancy as one such factor; however, the mechanisms underlying this phenomenon remain poorly understood. Studies conducted on animal models indicate that maternal immune activation (MIA) plays a pivotal role in the developmental deficits observed in offspring. Identifying the proteins involved in these processes is critical for deepening our understanding of NDDs pathogenesis and for developing potential preventive or therapeutic strategies.

Lipocalin 2 (Lcn2) is a protein associated with the innate immune response. It is secreted during infection and inhibits bacterial growth by iron sequestration. Lcn2 expression is strongly upregulated in the brain during inflammatory states, and its role can vary from anti-inflammatory to promoting pathological processes. Notably, both *in vivo* and *in vitro* studies suggest that Lcn2 influences the morphology and function of neurons and glial cells. In adult mice lacking the *Lcn2* gene, structural abnormalities in the dendritic tree and dendritic spines were observed, accompanied by impaired neuronal function. Moreover, these animals exhibited anxiety-like and depressive-like behaviors, as well as deficits in spatial learning. Despite these findings, the role of Lcn2 in the developing brain has yet to be investigated.

This study aimed to determine the role of Lcn2 in the processes underlying developmental disorders of the mouse brain caused by maternal immune activation. A bacterial infection model was employed in which pregnant mice received intraperitoneal injections of lipopolysaccharide (LPS), a bacterial endotoxin that induces an innate immune response. First, it was demonstrated that Lcn2 is expressed in the developing brain and that MIA increases *Lcn2* mRNA levels in fetal brains of both sexes. To evaluate whether these changes in Lcn2 expression influence developmental outcomes, transgenic mice were used. Pregnant Lcn2 Het females were subjected to the MIA procedure, and offspring with either wild-type or Lcn2-knockout genotypes were further analyzed. The results indicated that maternal immune activation induces sex-dependent expression of pro-inflammatory cytokines in the placenta and fetal brain, while the absence of Lcn2 modulates the

inflammatory response. In wild-type mice, MIA caused changes in the density and morphology of dendritic spines and influenced the excitability of hippocampal pyramidal neurons. These neural alterations were accompanied by behavioral disturbances resembling symptoms of neurodevelopmental disorders. Interestingly, *Lcn2* deletion under baseline conditions resulted in behavioral deficits similar to those observed in MIA offspring. The effects of both MIA and *Lcn2* deletion were sex-dependent. However, *Lcn2* silencing did not significantly affect the behavior of animals whose mothers were exposed to LPS during pregnancy. These findings cannot conclusively determine *Lcn2*'s contribution to the development of disorders triggered by maternal immune activation, given that the absence of the *Lcn2* alone produces similar behavioral impairments. However, they underscore the pivotal role of *Lcn2* in proper brain development under physiological conditions.

Wykaz najczęściej stosowanych skrótów

ADHD – (ang. *attention deficit hyperactivity disorder*) zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi

AMPA – (ang. *α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-isoxazolepropionian*) kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy

ASD – (ang. *autism spectrum disorders*) zaburzenia ze spektrum autyzmu

BBB – (ang. *blood-brain barrier*) bariera krew-mózg

CA1 – (ang. *cornu Ammonis 1*) róg Ammona 1, obszar hipokampa

DG – (ang. *dentate gyrus*) zakręt zębaty hipokampa

E – (ang. *embryonic day*) dzień rozwoju embrionalnego

EPM – (ang. *elevated plus maze*) podwyższony labirynt krzyżowy

FXS – (ang. *Fragile X syndrome*) zespół łamliwego chromosomu X

GFAP – (ang. *glial fibrillary acidic protein*) kwaśne białko włóknkowe gleju

HPA – (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*) oś podwzgórze-przysadka-nadnercza

IL-1 β – (ang. *interleukin 1 β*) interleukina 1 β

IL-6 – (ang. *interleukin 6*) interleukina 6

KO – (ang. *knock-out*) mysz z delecją genu

Lcn2 – (ang. *lipocalin 2*) – lipokalina 2

LPS – (ang. *lipopolysaccharide*) lipopolisacharyd

LTP – (ang. *long-term potentiation*) długotrwałe wzmocnienie synaptyczne

mEPSCs – (ang. *miniature excitatory postsynaptic currents*) miniaturowe pobudzające prądy postsynaptyczne

MIA – (ang. *maternal immune activation*) – aktywacja układu odpornościowego matki

mIPSCs – (ang. *miniature inhibitory postsynaptic currents*) miniaturowe hamujące prądy postsynaptyczne

MMP-9 – (ang. *matrix metalloproteinase-9*) metaloproteaza macierzowa 9

mPFC – (ang. *medial prefrontal cortex*) przyśrodkowa kora przedczołowa

NDDs – (ang. *neurodevelopmental disorders*) – zaburzenia neurorozwojowe

NF- κ B – (ang. *nuclear factor κ B*) jądrowy czynnik κ B

NMDA – (ang. *N-methyl-D-aspartic acid*) kwas N-metylo-D-asparaginowy

OUN – (ang. *central nervous system, CNS*) ośrodkowy układ nerwowy

P – (ang. *postnatal day*) dzień życia po urodzeniu

PBS – (ang. *phosphate-buffered saline*) zbuforowany roztwór soli fizjologicznej

PCR – (ang. *polymerase chain reaction*) reakcja łańcuchowa polimerazy

PFA – (ang. *paraformaldehyde*) paraformaldehyd

PFC – (ang. *prefrontal cortex*) kora przedczołowa

poly(I:C) – (ang. *polyinosinic:polycytidylic acid*) kwas poliinozynowo-policytydylowy

RT-qPCR – (ang. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją

SEM – (ang. *standard error of the mean*) błąd standardowy średniej

TLR – (ang. *toll-like receptor*)

TNF- α – (ang. *tumor necrosis factor α*) czynnik martwicy nowotworów

WT – (ang. *wild type*) myszy o dzikim (niezmodyfikowanym) genotypie

1. Wstęp

1.1. Najważniejsze etapy rozwoju mózgu u ludzi

Wszystkie złożone ludzkie zachowania kontrolowane przez dojrzały układ nerwowy — od percepcji bodźców czuciowych i kontrolowania reakcji ruchowych po funkcje poznawcze, takie jak uczenie się i pamięć — zależą od precyzyjnych połączeń tworzonych przez miliardy komórek nerwowych w trakcie rozwoju embrionalnego i postnatalnego. Utworzenie prawidłowych obwodów neuronalnych jest niezwykle złożonym procesem, który zależy od szeregu następujących po sobie etapów obejmujących 1) formowanie się płytki i cewy nerwowej, 2) powstawanie i migrację neuronów oraz gleju, 3) dojrzewanie komórek, 4) formowanie się synaps i kolców dendrytycznych oraz ich reorganizację, 5) eliminację części synaps, 6) mielinizację włókien nerwowych.

Układ nerwowy człowieka zaczyna rozwijać się około trzeciego tygodnia po zapłodnieniu, kiedy część komórek ektodermy, najbardziej zewnętrznej warstwy zarodkowej, zaczyna różnicować się w neuroektodermę, która tworzy płytkę nerwową (ang. *neural plate*), będącą prekursorem ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego (O’Rahilly i Gardner, 2008; Silbereis i in., 2016). Wkrótce potem płytka nerwowa zaczyna tworzyć wgłębienie, które następnie zamyka się tworząc cewę nerwową, w procesie zwanym neurulacją. Część ogonowa cewy nerwowej przekształca się w rdzeń kręgowy, podczas gdy z części głowowej uformuje się mózg (Silbereis i in., 2016). Z kolei wzdłuż cewy nerwowej część komórek migruje na boki i tworzy grzebień nerwowy, będący zaczątkiem obwodowego układu nerwowego (O’Rahilly i Müller, 2007).

Poszczególne struktury mózgu powstają w wyniku intensywnych podziałów komórkowych, migracji komórek i stopniowego ich różnicowania się. Początkowo neuralne komórki macierzyste (ang. *neural stem cells*), namnażają się symetrycznie, zwiększając swoją pulę, a tym samym powierzchnię cewy nerwowej, a następnie przekształcają się w komórki gleju promienistego (ang. *radial glia*), tworzące warstwę przykomorową (ang. *ventricular zone*) (Silbereis i in., 2016; Zecevic, 2004). Glej promienisty dzieli się asymetrycznie dając początek kolejnym komórkom gleju promienistego i komórkom progenitorowym lub neuronom, które formują warstwę okołokomorową (ang. *subventricular zone*) (Götz i Huttner, 2005). Post-mitotyczne

neurony migrują następnie na rusztowaniu stworzonym przez pionowe wypustki gleju promienistego tworząc płytkę korową (ang. *cortical plate*) (O’Rahilly i Gardner, 2008), a ich warstwowanie odbywa się według zasady „inside-out”- neurony, które opuszczają cykl komórkowy później migrują na dłuższe odległości, mijając wcześniej powstałe komórki. W przeciwieństwie do neuronów pobudzających, które w głównej mierze są wytwarzane lokalnie w warstwie przykomorowej, korowe i hipokampalne interneurony GABAergiczne powstają w kresomózgowiu brzuszonym w obrębie wyniosłości zwojowych (ang. *ganglionic eminences*), a następnie migrują stycznie w kierunku kory wykorzystując aksony korowych neuronów projekcyjnych (Hansen i in., 2013). Pierwsze komórki nerwowe pojawiają się w ludzkim mózgu około 7. tygodnia rozwoju (Bystron i in., 2006), a szczyt neurogenezy i migracji neuronów przypada na okres od 10. do 25. tygodnia ciąży (Silbereis i in., 2016; Buchsbaum i Cappello, 2019). Co istotne, w trakcie rozwoju następuje nadprodukcja komórek nerwowych - około 50% nowopowstałych neuronów ulega apoptozie (Raff i in., 1993; Yamaguchi i Miura, 2015). Różnicujące się komórki nerwowe zaczynają tworzyć wypustki neuronalne - aksony i dendryty, pojawiające się już pierwszym trymestrze ciąży (Haynes i Kinney, 2011; Vasung i in., 2010). W miarę wzrostu aksonów i dendrytów rozpoczyna się proces synaptogenezy, czyli formowania się połączeń synaptycznych. Początkowo synapsy tworzą się głównie na stożkach wzrostu dendrytów oraz na ich trzonach (Zecevic, 1998). Kolce dendrytyczne, czyli charakterystyczne wypustki w błonie dendrytów tworzące postsynaptyczną część większości synaps pobudzających, pojawiają się pod koniec drugiego trymestru ciąży (He i in., 2020; Lu i in., 2013) i dynamicznie się rozwijają, osiągając maksymalną liczbę między drugim a dziewiątym rokiem życia, w zależności od struktury mózgu i typu dendrytu (Petanjek i in., 2011).

Rozwój obwodów neuronowych zależy od koordynacji aktywności neuronalnej między neuronami pre- i postsynaptycznymi. Początkowo najważniejszym czynnikiem kształtującym sieci neuronowe jest spontaniczna aktywność neuronalna (Kirkby i in., 2013). Wraz z dojrzewaniem narządów zmysłów aktywność neuronów zaczyna być zależna od doświadczeń sensorycznych, które determinują reorganizację połączeń synaptycznych oraz eliminację ponad połowy nowopowstałych synaps (tzw. przycinanie synaptyczne, ang. *synaptic pruning*) (Holtmaat i Svoboda, 2009; Hofer i in., 2009). Procesy te zachodzą intensywnie w pierwszych latach po narodzinach, ale gęstość kolców

dendrytycznych stabilizuje się u ludzi dopiero w trzeciej dekadzie życia (Petanjek i in., 2011). Ta niezwykle intensywna reorganizacja połączeń synaptycznych zależna od doświadczenia zachodzi w ograniczonym okresie rozwoju nazywanym okresem krytycznym, który różni się długością i czasem wystąpienia w różnych obszarach mózgu i charakteryzuje się wzmożoną podatnością na modyfikacje i czynniki zakłócające (Knudsen, 2004).

Ważnym etapem rozwoju mózgu jest także gliogeneza, czyli proces powstawania i różnicowania się komórek glejowych, do których należą astrocyty, oligodendrocyty i mikroglej. Pierwsze dwie grupy komórek glejowych, podobnie jak neurony, wywodzą się głównej mierze z komórek gleju promienistego (Yang i in., 2022), a ich powstawanie zachodzi równolegle z synaptogenezą – rozpoczyna się w drugim trymestrze i trwa w okresie postnatalnym (Jakovcevski i in., 2009; Falcone i in., 2020; Holst i in., 2019; Roessmann i Gambetti, 1986). W miarę dojrzewania oligodendrocyty zaczynają produkować mielinę – lipidową osłonkę, która chroni aksony i pozwala na szybsze przewodzenie potencjałów czynnościowych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Proces mielinizacji rozpoczyna się około trzeciego trymestru i kontynuuje przez okres dojrzewania oraz w dorosłości (Jakovcevski i in., 2009). W przeciwieństwie do pozostałych komórek glejowych, mikroglej ma pochodzenie mezodermalne i najprawdopodobniej wywodzi się ze szpikowych komórek macierzystych, które po dotarciu do układu nerwowego ulegają odpowiednim przekształceniom (Monier i in., 2007). U człowieka pierwsze niedojrzałe komórki mikrogleju można zaobserwować w mózgu już w czwartym tygodniu ciąży, a zasiedlanie ośrodkowego układu nerwowego trwa do pierwszej połowy drugiego trymestru (Monier i in., 2007).

1.2. Przebieg rozwoju mózgu u myszy

Podstawowy schemat rozwoju układu nerwowego ssaków jest ewolucyjnie zachowany, dzięki czemu badania realizowane przy użyciu modeli zwierzęcych, dostarczają cennych informacji na temat mechanizmów leżących u podstaw tych procesów. W przypadku modelu mysiego, który został wykorzystany w niniejszej pracy, sekwencja głównych etapów związanych z rozwojem mózgu jest taka sama jak u człowieka, jednak zachodzą one w innej skali czasowej i są niejako „opóźnione”. Długość ciąży u myszy wynosi od 19 do 21 dni. Przyjmuje się, że pierwsza i druga połowa ciąży u gryzoni jest w przybliżeniu

odpowiednikiem pierwszego i drugiego trymestru ciąży u ludzi, natomiast odpowiednik trzeciego trymestru przypada u myszy na pierwsze dwa tygodnie życia noworodkowego (Clancy i in., 2007; Guma i in., 2019; Semple i in., 2013). Wynika to z faktu, że wiele procesów rozwojowych, które u człowieka zachodzą jeszcze w życiu płodowym, u gryzoni rozpoczyna się lub kontynuuje w znacznym stopniu już po urodzeniu (Semple i in., 2013). Powstawanie i migracja mysich neuronów rozpoczynają się w połowie ciąży, około E10 - E12 (ang. *embryonic day*; dzień rozwoju embrionalnego), podobnie jak zasiedlanie mózgu przez komórki mikrogleju (García-Moreno i in., 2007; Ginhoux i in., 2010). Chociaż neurogeneza jest w dużej mierze zakończona przed urodzeniem, migracja neuronów powstałych później trwa również postnatalnie (Farhy-Tselnicker i Allen, 2018). Z kolei astrogliogeneza zaczyna się dopiero w okolicy narodzin i kontynuuje w okresie postnatalnym (Farhy-Tselnicker i Allen, 2018). Co istotne, wspomniane „opóźnienie” rozwojowe dotyczy również tworzenia synaps i kolców dendrytycznych. Pierwsze, nieliczne i niedojrzałe synapsy w mysim mózgu są obserwowane około E15-18, ale kolce dendrytyczne pojawiają się dopiero po urodzeniu (Balslev i in., 1996; Li i in., 2010). Wypustki filopodialne dendrytów są widoczne w pierwszym dniu po urodzeniu (P1, ang. *postnatal*; dzień po narodzinach), a dojrzałe kolce obserwuje się około P7–10 (Fiala i in., 1998; Li i in., 2010; Petit i in., 1988). U gryzoni maksymalna gęstość kolców dendrytycznych zostaje osiągnięta pod koniec pierwszego miesiąca życia, a następnie w okresie wczesnej młodości dochodzi do redukcji części synaps (Orner i in., 2014; Koss i in., 2014).

Rozwój układu nerwowego jest kontrolowany przez ściśle regulowaną ekspresję genów, jak i środowisko zewnętrzne, zarówno w okresie pre- i jak i postnatalnym. Każde istotne odchylenie od normalnej trajektorii rozwoju na wczesnym etapie życia może zakłócać formowanie się połączeń nerwowych i w rezultacie prowadzić do rozwoju zaburzeń neurorozwojowych.

1.3. Zaburzenia neurorozwojowe

Zaburzenia neurorozwojowe (ang. *neurodevelopmental disorders*, NDDs) to grupa zaburzeń behawioralnych i poznawczych, które mają początek w okresie rozwojowym, zazwyczaj we wczesnym dzieciństwie. Zaburzenia te charakteryzują się deficytami rozwojowymi związanymi z istotnymi trudnościami w nabywaniu i wykonywaniu określonych funkcji intelektualnych, motorycznych, językowych lub społecznych

(Światowa Organizacja Zdrowia, 2024). Międzynarodowa Statystyczna Klasyfikacja Chorób i Problemów Zdrowotnych opracowana przez Światową Organizację Zdrowia wśród zaburzeń neurorozwojowych wymienia m. in. zaburzenia ze spektrum autyzmu (ang. *autism spectrum disorder*, ASD), zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ang. *attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD), zaburzenia rozwoju intelektualnego, zaburzenia mowy i języka czy zaburzenia uczenia się (Światowa Organizacja Zdrowia, 2019). Liczne dowody wskazują, że także schizofrenia ma podłoże neurorozwojowe i wielu badaczy i klinicystów zalicza ją do tej grupy zaburzeń. Mimo, że objawy pozytywne schizofrenii (t.j. halucynacje, zdeorganizowana mowa itp.) zwykle pojawiają się pod koniec okresu dojrzewania, etiologia tej choroby prawdopodobnie wynika z wydarzeń mających miejsce w trakcie rozwoju prenatalnego lub we wczesnym okresie postnatalnym (Rapoport i in., 2012; Fatemi i Folsom, 2009; Weinberger i Marengo, 2003).

Według amerykańskiej agencji CDC (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*) częstość występowania zaburzeń neurorozwojowych w Stanach Zjednoczonych wynosi 13,87%, a wskaźnik ten wzrósł o około 9,5% w ciągu ostatniej dekady (Zablotsky i in., 2019), co prawdopodobnie związane jest ze zwiększoną świadomością społeczną oraz zmianami standardów diagnostycznych. Należy również zaznaczyć, że mężczyźni średnio dwukrotnie częściej otrzymują diagnozę zaburzeń neurorozwojowych, w tym ADHD, ASD i schizofrenii, niż kobiety (Pinares-Garcia i in., 2018; Polyak i in., 2015), a przyczyny tego zjawiska nie są w pełni zrozumiałe. Różnice te mogą mieć podłoże biologiczne, jednak nie wykluczone, że manifestacja objawów klinicznych u kobiet jest inna niż u mężczyzn, a obecne kryteria diagnostyczne lepiej odzwierciedlają symptomy charakterystyczne dla płci męskiej.

Co ciekawe, objawy zaburzeń neurorozwojowych często nakładają się na siebie, co oznacza, że osoby z różnymi diagnozami NDDs mogą doświadczać podobnych trudności w określonych obszarach funkcjonowania. Obejmują one m. in. deficyty umiejętności społecznych, zaburzenia poznawcze i trudności w uczeniu się, problemy z regulacją emocji i zaburzenia lękowe czy zaburzenia rytmu dobowego (England-Mason, 2020; Hall i in., 2023; Kirsch i in., 2020; Quenneville i in., 2022). Warto jednak zauważyć, że występowanie oraz nasilenie konkretnych objawów może znacznie różnić się pomiędzy pacjentami

nawet w obrębie tego samego typu zaburzenia. Taka zmienność i nakładanie się objawów są typowe dla wielu zaburzeń psychicznych, co doprowadziło amerykański Narodowy Instytut Zdrowia Psychicznego (ang. *National Institute of Mental Health*, NIMH) do stworzenia ram badawczych RDoC (ang. *Research Domain Criteria*), czyli wytycznych prowadzenia badań dotyczących zdrowia psychicznego, które skupiają się na badaniu konkretnych wymiarów (np. czynników ryzyka lub określonych objawów), zamiast całościowego modelowania poszczególnych zaburzeń. Takie podejście pozwala na lepsze zrozumienie mechanizmów i różnic w nasileniu oraz ekspresji symptomów w poszczególnych przypadkach.

Etiologia zaburzeń neurorozwojowych w większości przypadków pozostaje nieznana. Badania na bliźniętach wykazały wysoką zgodność występowania tych zaburzeń u bliźniąt jednojajowych, znacznie niższą natomiast u bliźniąt dwujajowych, co sugeruje istotne podłoże genetyczne NDDs (Tick i in., 2016). Rozwój technologii sekwencjonowania w ostatnich latach umożliwił identyfikację genetycznych czynników ryzyka. Do zaburzeń neurorozwojowych wywoływanych przez mutacje w pojedynczych genach należą m.in. zespół łamliwego chromosomu X (ang. *Fragile X syndrome*, FXS), wywołany przez mutację w genie *FMR1*, czy zespół Retta wywołany przez mutację w genie *MECP2* (LaSalle i Yasui, 2009; Persico i Napolioni, 2013). Jednogenowe formy zaburzeń neurorozwojowych są jednak rzadkie, a większość zidentyfikowanych wariantów genetycznych nie jest bezpośrednią przyczyną choroby, lecz jedynie zwiększa prawdopodobieństwo jej rozwoju, co wskazuje na konieczność wystąpienia dodatkowych czynników. Obecnie NDDs uważa się za syndromy wieloczynnikowe, u których podstaw leżą skomplikowane interakcje czynników genetycznych i środowiskowych (Chaste i Leboyer, 2012). Badania wskazują, że czynniki środowiskowe, które oddziałują w krytycznych okresach rozwojowych u osób z podatnym podłożem genetycznym, odgrywają kluczową rolę w powstawaniu NDDs i wpływają na ich wysoką zmienność kliniczną. Szczególne znaczenie ma okres prenatalny, a wśród czynników powiązanych z rozwojem NDDs można wymienić m.in. ekspozycję na zanieczyszczenia, matczyną otyłość, stres i choroby autoimmunologiczne, a także infekcje w ciąży (Han i in., 2021).

1.4. Aktywacja układu odpornościowego matki w ciąży jako czynnik ryzyka wystąpienia zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa – dowody z badań epidemiologicznych

Rosnąca liczba badań epidemiologicznych wskazuje, że infekcje matki w czasie ciąży są związane z wyższym ryzykiem wystąpienia zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa. Niedawna metaanaliza uwzględniająca 15 badań kohortowych i kliniczno-kontrolnych obejmujących ponad 40 000 przypadków ASD wykazała, że prawdopodobieństwo wystąpienia tego zaburzenia u potomstwa jest o 13% wyższe, jeśli w czasie ciąży matka była narażona na infekcję, a wzrasta do 30% jeśli konieczna była hospitalizacja (Jiang i in., 2016). Analiza podgrup wskazała, że infekcje bakteryjne, zwłaszcza w drugim i trzecim trymestrze, zwiększają ryzyko urodzenia dziecka, które później zostanie zdiagnozowane z ASD. Z kolei według najnowszej metaanalizy, obejmującej 36 badań, infekcja lub gorączka w czasie ciąży zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia ASD u potomstwa o 32% (Tioleco i in., 2021). W przeciwieństwie do poprzedniego badania nie zaobserwowano jednak, aby czas infekcji lub jej rodzaj istotnie wpływały na ryzyko wystąpienia tego zaburzenia.

W przypadku schizofrenii wykazano natomiast, że infekcje różyczki, grypy, toksoplazmozy i wirusa opryszczki typu 2 podczas ciąży przyczyniały się do wyższego ryzyka wystąpienia tego zaburzenia u potomstwa (Brown i in., 2001; Brown i Derkits, 2010; Khandaker i in., 2013). Dwie niedawne metaanalizy potwierdziły istotny związek między infekcją prenatalną a zwiększonym ryzykiem wystąpienia zaburzeń psychiatrycznych, w tym schizofrenii (Saatci i in., 2021; Zhou i in., 2021). W analizie podgrup wykazano, że w przypadku wystąpienia infekcji w ciąży prawdopodobieństwo diagnozy schizofrenii u potomstwa zwiększa się o 28% lub 65%, w zależności od badania. Istotnymi czynnikami wpływającymi na modulowanie ryzyka był także czas i typ infekcji, gdyż np. drugi trymestr ciąży oraz infekcja wirusem opryszczki typu 2 wiązały się z większym obciążeniem (Saatci i in., 2021).

Ostatnie badania sugerują także związek infekcji prenatalnej z ADHD. Autorzy dwóch metaanaliz z 2022 r. wskazali na 25% i 30% wzrost prawdopodobieństwa wystąpienia tego zaburzenia u dzieci matek, które przeszły infekcję w czasie ciąży (Ayubi i Mansori, 2022; Zhu i in., 2022). Należy jednak zwrócić uwagę na ograniczenia tych doniesień, a zwłaszcza niewielką liczbę badań uwzględnionych w obu metaanalizach (9 i 8) oraz znaczną ich

heterogeniczność, co podkreśla potrzebę przeprowadzenia dalszych dobrze zaprojektowanych badań kohortowych na większych próbach, aby potwierdzić te odkrycia.

Chociaż niektóre z patogenów, takie jak różyczka czy wirus opryszczki, mogą zakażać płód poprzez transmisję pionową i bezpośrednio wpływać na jego rozwój, pozostałe drobnoustroje chorobotwórcze, które nie przekraczają bariery łożyskowej, również przyczyniają się do zwiększania ryzyka NDDs (Han i in., 2021). Hipoteza aktywacji układu odpornościowego matki (ang. *maternal immune activation*, MIA) zakłada, że nie infekcja konkretnym patogenem, ale raczej matczyna odpowiedź odpornościowa wpływa na zaburzenie procesów rozwojowych w mózgu płodu. Argumentów na poparcie tej hipotezy dostarczają badania, które wskazują, że nie tylko infekcje, ale także różnorodne przewlekłe stany zapalne matki, takie jak choroby autoimmunologiczne, astma czy otyłość, stanowią czynniki zwiększające prawdopodobieństwo diagnozy zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa (Han i in., 2021).

1.5. Aktywacja układu odpornościowego matki w ciąży jako czynnik ryzyka wystąpienia zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa - modele zwierzęce

Ograniczeniem badań epidemiologicznych jest ich charakter obserwacyjny, co uniemożliwia pełne zrozumienie przyczynowego związku między MIA a występowaniem NDDs. Podkreśla to wyjątkową użyteczność modeli zwierzęcych, które przyczyniają się do wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw tych zjawisk. Rosnąca liczba dowodów z badań na zwierzętach potwierdza, że aktywacja układu odpornościowego matki w okresie prenatalnym może znacząco wpływać na rozwój mózgu potomstwa i tym samym odgrywać kluczową rolę w etiologii zaburzeń neurorozwojowych.

1.5.1. Przegląd zwierzęcych modeli MIA

Badania na zwierzętach różnią się pod względem wykorzystywanych gatunków, rodzaju i dawki substancji stosowanych do indukcji MIA, czasu interwencji, a także wieku i płci potomstwa oraz badanych struktur mózgowych (obszerny przegląd na ten temat można znaleźć w artykułach Gumusoglu i Stevens (2019), Meyer i in. (2009), Solek i in. (2018)). Większość badań koncentrujących się na skutkach MIA została przeprowadzona z udziałem myszy i szczurów, chociaż kilka badań dotyczyło także naczelnych (głównie

makaków). Aktywacja układu odpornościowego matki może odbywać się poprzez bezpośrednie zakażenie konkretnym patogenem (np. wirusem, bakterią lub pasożytem), jednak zdecydowana większość badań wykorzystuje stymulację układu odpornościowego za pomocą substancji imitujących infekcje bakteryjne lub wirusowe, takich jak odpowiednio lipopolisacharyd (ang. *lipopolysaccharide*, LPS) i kwas poliinozynowo-policytydylowy (ang. *polyinosinic:polycytidylic acid*, poly(I:C)). LPS jest endotoksyną bakteryjną - stanowi główny składnik zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych i poprzez oddziaływanie z receptorami TLR4 (ang. *toll-like receptor*) indukuje nieswoistą odpowiedź immunologiczną u zwierząt i ludzi (Aderem i Ulevitch, 2000). Z kolei poly(I:C) jest syntetycznym wirusowym RNA, który wywołuje podobne do LPS efekty immunologiczne za pośrednictwem receptorów TLR3 (Matsumoto i Seya, 2008). Aktywacja receptorów TLR prowadzi do indukcji szlaków sygnalizacyjnych, które aktywują czynniki transkrypcyjne, takie jak m. in. NF-κB (ang. *nuclear factor κB*, jądrowy czynnik κB) i IRF3 (ang. *interferon regulatory factor 3*, czynnik regulujący interferon 3), czego wynikiem jest m.in. produkcja cytokin i interferonów, które inicjują reakcję zapalną oraz mogą wywoływać ogólnoustrojowy stan zapalny. W porównaniu z bezpośrednim zakażeniem patogenami LPS i poly(I:C) wywołują bardziej ograniczoną i przewidywalną odpowiedź immunologiczną, co pozwala na bardziej precyzyjną kontrolę czasu i intensywności MIA (Meyer i in., 2009). W badaniach na gryzoniach dawki LPS wahają się od 25 µg/kg do ponad 1 mg/kg, a w przypadku poly(I:C) od 250 µg/kg do ponad 20 mg/kg. Czas podania substancji również może się znacznie różnić w zależności od przyjętego modelu - od bardzo wczesnych etapów ciąży, takich jak dzień 9 embriogenezy (E9), do tak późnych jak E19, co odpowiada w przybliżeniu pierwszemu i drugiemu trymestrowi ciąży u ludzi. Oprócz jednorazowych iniekcji wykorzystuje się także wielokrotne podania, np. przez dwa lub trzy kolejne dni. Wszystkie te zmienne determinują znaczną heterogeniczność badań, co wpływa na istotne zróżnicowanie obserwowanych skutków MIA i trudność porównywania badań między sobą.

1.5.2. Wpływ MIA na zachowanie zwierząt

Kryteria diagnostyczne dla zaburzeń neurorozwojowych takich jak ASD, ADHD czy schizofrenia opierają się głównie na objawach behawioralnych, co sprawia, że kluczowa jest walidacja modeli zwierzęcych poprzez analizę wpływu MIA na zachowanie zwierząt.

Klika obszernych artykułów przeglądowych (Boksa, 2010; Dunaevsky i Bergdolt, 2019; Solek i in., 2018) podsumowuje różnorodne konsekwencje behawioralne protokołów MIA. U zwierząt narażonych na MIA obserwuje się m.in. zaburzenia zachowań społecznych, zachowania powtarzalne, zachowania związane z lękiem, upośledzenie uczenia się i pamięci, deficyty hamowania przedimpulsowego czy anhedonię. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę najczęściej opisywanych u potomstwa MIA deficytów behawioralnych.

Jednym z kluczowych objawów wielu NDDs – zwłaszcza ASD, ale także schizofrenii czy ADHD – są zaburzenia zachowań społecznych (Cotter i in., 2018; Hooley, 2010; Nijmeijer i in., 2008; Savla i in., 2013; Supekar i in., 2013). Co istotne, zarówno myszy jak i szczury są gatunkami społecznymi, co oznacza, że interakcje społeczne mają kluczowe znaczenie dla ich funkcjonowania w grupie. Zachowania społeczne gryzoni ocenia się m.in. w teście trójkomorowym (ang. *three-chamber test*), podczas którego porównuje się czas jaki zwierzę spędza w komorze z nieznanym osobnikiem tego samego gatunku do czasu spędzonego w komorze z obiektem nieożywionym lub w pustej komorze. W teście tym można również badać preferencję nowości społecznej (ang. *social novelty preference*), czyli czas spędzony na interakcji z osobnikiem nieznanym w porównaniu do osobnika znanego. Istotnym elementem komunikacji społecznej u gryzoni są także wokalizacje ultradźwiękowe (ang. *ultrasonic vocalizations*, USVs), które można badać już na wczesnym etapie życia. Deficyty interakcji społecznych są konsekwentnie obserwowane u potomstwa narażonego na MIA w okresie prenatalnym (Kentner i in., 2019). Aktywacja układu odpornościowego matki zarówno przy użyciu LPS jak i poly(I:C) na różnych etapach rozwoju prenatalnego skutkowałą spadkiem zainteresowania nieznanymi osobnikami u dorosłego potomstwa MIA – zwierzęta te spędzały więcej lub porównywalną ilość czasu na interakcji z obiektem nieożywionym, pustą komorą lub znanym im osobnikiem (Bitanirwe i in., 2010; Choi i in., 2016; Dutra i in., 2023; Fernández de Cossío i in., 2017; Labouesse i in., 2015; Malkova i in., 2012; Mattei i in., 2014; Wu i in., 2018). Zarówno u młodych jak i dorosłych gryzoni po MIA wykazano także zmiany liczby i czasu trwania USVs (Baharnoori i in., 2012; Fernández de Cossío i in., 2017; Gzielo i in., 2021; Gzielo i in., 2023; Malkova i in., 2012). Co istotne, również makaki narażone na MIA wykazywały nieprawidłowe zachowania społeczne (Bauman i in., 2014; Machado i in., 2015).

Kluczowym symptomem ASD są także zachowania powtarzalne, które obejmują stereotypowe ruchy motoryczne, a także nadmierne i uporczywe zrytualizowane wzorce zachowań (np. obsesyjne układanie lub sortowanie przedmiotów w określony sposób) (Leekam i in., 2011; Światowa Organizacja Zdrowia, 2024). Do badania obecności takich tendencji u gryzoni wykorzystuje się test zakopywania kulek oraz test samopielęgnacji (ang. *self-grooming test*) (Silverman i in., 2010). Testy te opierają się na obserwacji zachowań naturalnie występujących, takich jak kopanie i zakopywanie, a także czyszczenie sierści, których zwiększone nasilenie może świadczyć o występowaniu zachowań powtarzalnych. Wzrost liczby zakopanych kulek (będący miarą nadmiernego kopania) oraz nadmierną pielęgnację futra zaobserwowano u potomstwa MIA w licznych badaniach w modelu infekcji wirusowej i bakteryjnej, indukowanej zarówno w środkowym okresie ciąży (E9.5, E10.5, E12.5) jak i w późniejszych jej etapach (E15) (Choi i in., 2016; Coiro i in., 2015; Fernández de Cossío i in., 2017; Kirsten i Bernardi, 2017; Malkova i in., 2012; Pendyala i in., 2017; Wu i in., 2015).

W badaniach nad skutkami behawioralnymi MIA stosuje się także ocenę występowania zaburzeń poznawczych, takich jak m.in. trudności w uczeniu się i zapamiętywaniu, które są ważnym objawem negatywnym schizofrenii, ale mogą dotyczyć również pacjentów z ASD (Cicero i in., 2014; Gold i in., 2008; Wang i in., 2017). W tym celu stosuje się kilka testów behawioralnych, takich jak m.in. labirynt wodny Morrisa (ang. *Morris water maze*), labirynt T, labirynt Y czy test rozpoznawania nowego obiektu (ang. *novel object recognition test*), które wykorzystują różnorodne bodźce awersyjne i apetytywne lub wrodzone skłonności gryzoni, aby badać uczenie się, pamięć wzrokowo-przestrzenną czy pamięć operacyjną. Iniekcje LPS i poly(I:C) na różnych etapach rozwoju prenatalnego często skutkowały upośledzeniem uczenia się i pamięci u dorosłych gryzoni (Baharnoori i in., 2009; Batinić i in., 2016; Giovanoli i in., 2015; Labouesse i in., 2015; MacDowell i in., 2017; Zhang i van Praag, 2015), jednak w niektórych badaniach wykazano jedynie niewielki efekt lub jego brak (Abazyan i in., 2010; Han i in., 2011).

Badania wskazują, że NDDs często współwystępują z zaburzeniami lękowymi (England-Mason, 2020; Kirsch i in., 2020; Quenneville i in., 2022), a fenotyp ten także obserwuje się u potomstwa MIA (Quagliato i in., 2021). Do oceny zachowań lękowych u gryzoni wykorzystuje się ich naturalne skłonności do unikania otwartych i podwyższonych

przestrzeni, które ocenia się m.in. w teście podwyższonego labiryntu krzyżowego (ang. *elevated plus maze*, EPM). Zmniejszona eksploracja otwartych części labiryntu może świadczyć o podwyższonym poziomie lęku. Nasilenie zachowań lękowych u potomstwa narażonego na MIA w modelu infekcji wirusowej i bakteryjnej raportowano zarówno po aktywacji układu odpornościowego matki w okolicy połowy okresu prenatalnego gryzoni (E9, E12.5), jak i na późniejszych etapach życia płodowego (E15-17, E17) (Babri i in., 2014; da Silveira i in., 2017; Depino, 2015; Hsueh i in., 2017), a efekt był zależny od badanego szczepu (Babri i in., 2014).

Hamowanie przedimpulsowe (ang. *prepulse inhibition*, PPI) jest zjawiskiem neurologicznym, polegającym na osłabieniu reakcji przestachu na silny (zwykle akustyczny) bodziec (tzw. impuls) poprzez wcześniejsze zastosowanie słabszego bodźca (tzw. pre-impuls). Deficyty w PPI objawiające się trudnością w selekcji i filtrowaniu zbędnych informacji powiązane są z nieprawidłowościami bramkowania czuciowo-ruchowego, które obserwuje się u pacjentów cierpiących na schizofrenię. Niedobory te są także obserwowane u zwierząt w wielu protokołach MIA (Garay i in., 2013; Giovanoli i in., 2016; Hadar i in., 2017; Lipina i in., 2013; Mattei i in., 2017; Meyer i in., 2008; Wu i in., 2015).

1.5.3. Zmiany anatomiczne w mózgu obserwowane w zwierzęcych modelach MIA

Biorąc pod uwagę mnogość i różnorodność zaburzeń zachowania obserwowanych u potomstwa MIA, kluczowa jest odpowiedź na pytanie jakie są leżące u ich podstaw nieprawidłowości w budowie mózgu i w jaki sposób wpływają one na jego funkcjonowanie.

Potomstwo narażone na MIA wykazuje wiele neuropatologii związanych z zaburzeniami neurorozwojowymi, takich jak powiększenie komór mózgowych, zmniejszenie objętości kilku obszarów mózgu, w tym kory mózgowej i hipokampa, czy aberracje mózdzku (da Silveira i in., 2017; Estes i McAllister, 2016; Piontkewitz i in., 2011; Short i in., 2010). Na przykład w mózgach mysich płodów E18.5, pochodzących od matek poddanych iniekcji poly(I:C) w E12.5, zaobserwowano nieprawidłową organizację kory mózgowej (Choi i in., 2016), a co ciekawe, podobne malformacje zauważono w tkance mózgowej pobranej pośmiertnie od pacjentów z ASD (Casanova i in., 2013; Stoner i in., 2014). Badania

histologiczne wskazują, że u podstaw zmniejszenia objętości niektórych struktur mózgu u potomstwa MIA mogą leżeć zmiany w gęstości komórek nerwowych. Szczególnie często obserwowano spadek gęstości neuronów GABAergicznym, a konkretnie komórek Purkiniego w mózdzku (Shi i in., 2009; Naviaux i in., 2013) oraz interneuronów parwalbuminowych w hipokampie i korze mózgowej (Matsuura i in., 2018; Meyer i in., 2008; Wischhof i in., 2015; Zhang i van Praag, 2015). Fenotyp ten może być związany z upośledzeniem proliferacji i migracji komórek nerwowych, które również obserwowano u potomstwa narażonego na MIA. Zarówno iniekcje LPS jak i poly(I:C) skutkowały zmniejszeniem liczby komórek progenitorowych lub proliferujących w zakręcie zębatym hipokampa oraz w korze mózgowej (Cui i in., 2009; Lin i Wang, 2014; Mattei i in., 2014; Piontkewitz i in., 2011). Dodatkowo wykazano, że ekspresja genów kilku białek zaangażowanych w migrację styczną interneuronów była zmniejszona w mózgu płodu cztery godziny po podaniu LPS (Oskvig i in., 2012). Zaobserwowano także zmniejszoną produkcję reeliny, glikoproteiny zaangażowanej w migrację neuronów zarówno w mózgu noworodków (Fatemi i in., 1999), w trakcie dojrzewania (Harvey i Boksa, 2012; Nouel i in., 2012) jak i u dorosłego potomstwa MIA (Meyer i in., 2008).

Innymi skutkami aktywacji immunologicznej matki są deficyty obserwowane w układach neuroprzekaźników, takie jak m. in. zmiany ekspresji i poziomów neuroprzekaźników, ich receptorów i transporterów. Nieprawidłowości wykazano głównie w obrębie układu glutaminergicznego, GABA-ergicznego, ale także dopaminergicznego, serotonergicznego oraz cholinergicznego (Dunaevsky i Bergdolt, 2019; Goeden i in., 2016; Luan i in., 2018; Luoni i in., 2017; Pratt i in., 2013; Reisinger i in., 2016; Richetto i in., 2014; Tang i in., 2013). Co istotne zaburzenia równowagi w poziomie dopaminy, serotoniny i innych neuroprzekaźników zostały również powiązane z neuropatologią schizofrenii (Yang i Tsai, 2017) oraz ASD (Fernández i in., 2018).

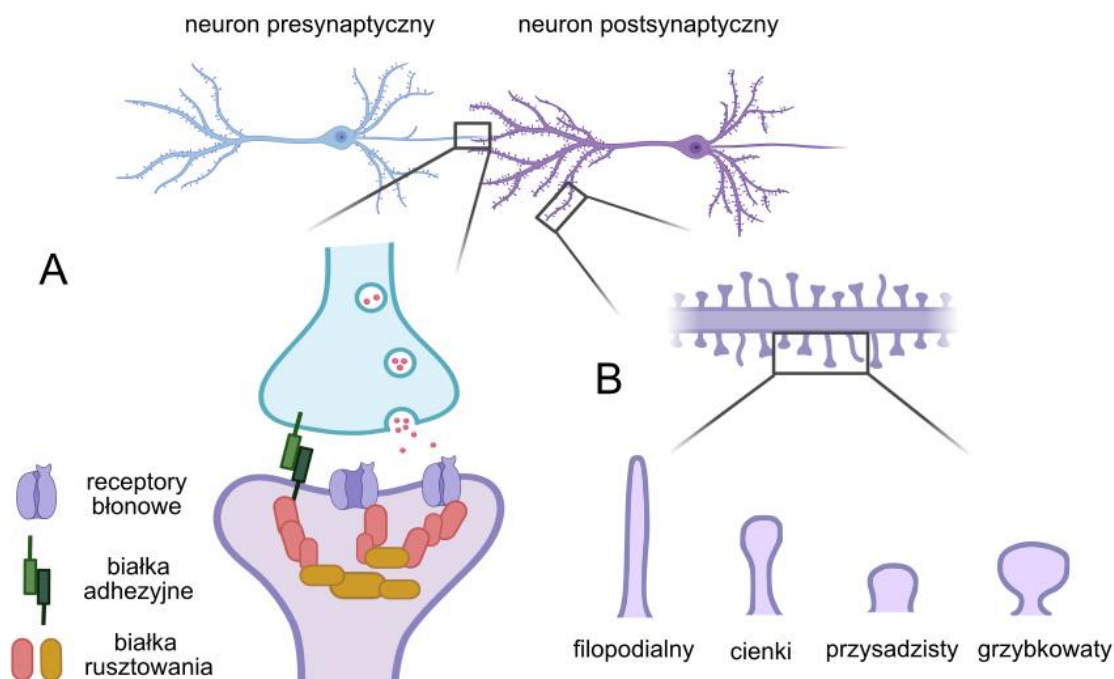
Wydaje się jednak, że jednym z najważniejszych zaburzeń obserwowanych u potomstwa MIA są deficyty synaptyczne, które zostaną opisane w kolejnym podrozdziale.

1.5.4. Wpływ MIA na strukturę i funkcję synaps oraz podstawowe właściwości elektrofizjologiczne neuronów

W ostatnich dwóch dekadach nastąpił ogromny postęp w zrozumieniu genetycznych podstaw zaburzeń neurorozwojowych, głównie dzięki rozwojowi technologii

sekwencjonowania DNA i zaawansowanej analizy genomu. Metody te pozwoliły zidentyfikować geny ryzyka rozwoju NDDs, wśród których największą grupę stanowiły geny związane z funkcjonowaniem synaps. Warianty genetyczne powiązane z zaburzeniami neurorozwojowymi obejmują różne kategorie funkcjonalne komponentów synaptycznych (Ryc. 1A), w tym białka rusztowania (np. SHANK), cząsteczki sygnalizacyjne czy kompleksy adhezyjne, takie jak neureksyny i neuroliginy (Gilman i in., 2011; Monteiro i Feng, 2017; O’Roak i in., 2012; Südhof, 2008; Tarabeux i in., 2011). Odkrycia te doprowadziły do wprowadzenia pojęcia „synaptopatii” i uwydatniły znaczenie nieprawidłowości funkcji synaps jako jednego z patomechanizmów zaburzeń neurorozwojowych (Grant, 2012).

Większość synaps pobudzających w dorosłym mózgu jest zlokalizowana na kolcach dendrytycznych. Struktury te występują w kontinuum kształtów, które zazwyczaj klasyfikuje się na cztery główne kategorie (Ryc. 1B): filopodialne (ang. *filopodial*), cienkie (ang. *thin*), przysadziste (ang. *stubby*) i grzybkowate (ang. *mushroom*) (Peters i Kaiserman-Abramof, 1970). Cechy morfologiczne kolców dendrytycznych zmieniają się w odpowiedzi na bodźce środowiskowe i wpływają na siłę połączeń synaptycznych (Araya i in., 2014; Bosch i Hayashi, 2012). Kolce grzybkowate, z dużą, wyraźnie zaznaczoną główką i krótką szyjką, uważa się za dojrzałą formę kolców dendrytycznych, zdolną do tworzenia najefektywniejszych połączeń synaptycznych (Hayashi i Majewska, 2005; Yoshihara i in., 2009). Kolce filopodialne, długie i cienkie wypustki pozbawione wyraźnej główki, uznawane są za struktury niedojrzałe, które najprawdopodobniej nie tworzą funkcjonalnych połączeń nerwowych i dominują w trakcie rozwoju, a ich odsetek w dorosłym mózgu jest niewielki (Berry i Nedivi, 2017).



Ryc. 1. Budowa i kształt kolców dendrytycznych. **A** Schemat przedstawiający główne elementy synapsy pobudzającej, utworzonej przez zakończenie aksonu neuronu presynaptycznego i kolec dendrytyczny neuronu postsynaptycznego. W obrębie kolca dendrytycznego zaznaczono grupy białek, które powiązano z ryzykiem rozwoju NDDs: receptory błonowe, białka adhezyjne i białka rusztowania. **B** Schemat przedstawiający główne rodzaje kształtów kolców dendrytycznych: kolec filopodialny, cienki, przysadzisty i grzybkowaty. Zmodyfikowano z Serrano i in. (2022).

Co istotne, nieprawidłowości w gęstości i morfologii kolców dendrytycznych są częstymi patologiami obserwowanymi u osób, u których zdiagnozowano ASD czy schizofrenię (Pekala i in., 2021). U pacjentów cierpiących na ASD zaobserwowano wzrost gęstości kolców dendrytycznych w różnych obszarach kory mózgowej (m.in. w korze czołowej, skroniowej i ciemieniowej), a także w ciele migdałowatym (Hutsler i Zhang, 2010; Tang i in., 2014; Weir i in., 2018). Co ciekawe, w jednym z badań zwiększona gęstość kolców dendrytycznych była obecna tylko w przypadku młodszych pacjentów (w wieku 7 - 18 lat), a nie wykazano różnic w przypadku pacjentów dorosłych (18 - 46 lat), sugerując, że zmiany te mogą mieć charakter przejściowy (Weir i in., 2018). Zaburzenia kolców dendrytycznych obserwowano także w przypadku FXS, który jest najczęstszą przyczyną autyzmu wynikającego z mutacji w pojedynczym genie. U kilku pacjentów z FXS zaobserwowano nietypowo długie i cienkie kolce z wydatnymi główkami w kilku obszarach korowych, a także zmianę proporcji różnych kształtów kolców – zwiększoną liczbę kolców długich

o niedojrzałym fenotypie, a wzrost liczby kolców krótkich i bardziej dojrzałych (Hinton i in., 1991; Irwin i in., 2001; Rudelli i in., 1985). Mimo, że wspomniane badania nie zawsze były ilościowe, to nieprawidłowy fenotyp kolców dendrytycznych został dobrze odtworzony w modelach zwierzęcych FXS, czyli u myszy z delecją genu *Fmr1* (Comery i in., 1997; Cruz-Martín i in., 2010; Galvez i Greenough, 2005; Irwin i in., 2002; Nimchinsky i in., 2001). Również w przypadku schizofrenii liczne badania sugerują obecność zmian gęstości kolców dendrytycznych w różnych strukturach mózgu. Wykazano m.in spadek gęstości kolców dendrytycznych komórek piramidowych w kilku obszarach korowych oraz w hipokampie (Garey i in., 1998; Glantz i Lewis, 2000; Kolomeets i in., 2005; Konopaske i in., 2014; Rosoklija i in., 2000), a także komórek Purkiniego w mózdzku (Mavroudis i in., 2017), ale wzrost gęstości kolców dendrytycznych w prążkowie (Roberts i in., 2005, 2005).

Wyniki badań dotyczących wpływu MIA na gęstość i morfologię kolców dendrytycznych u gryzoni zostały przedstawione w kilku pracach. Aktywacja układu odpornościowego matek za pomocą poly(I:C) na wczesnym etapie ciąży (E9.5) powodowała wzrost gęstości kolców dendrytycznych neuronów piramidowych pierwszorzędowej kory somatosensorycznej oraz przyśrodkowej kory przedczołowej (ang. *medial prefrontal cortex*, mPFC) u dorosłych myszy, a zmianom tym towarzyszyły deficyty interakcji społecznych, zachowania powtarzalne oraz wzrost zachowań lękowych (Ikezu i in., 2020; Soumiya i in., 2011). Co ciekawe, iniekcje poly(I:C) w podobnym czasie (E12.5) wywołały u zwierząt niedojrzałych (P17-19 i P30) odwrotny efekt, to jest spadek gęstości kolców dendrytycznych w korze somatosensorycznej (Coiro i in., 2015). Badanie zmian gęstości kolców dendrytycznych komórek ziarnistych zakrętu zębatego (ang. *dentate gyrus*, DG) hipokampa wywołanych iniekcjami LPS w E10.5 również ujawniło zależne od wieku potomstwa skutki. U młodych szczurów (P21) stwierdzono wzrost, a dorosłych osobników (P90) spadek gęstości kolców dendrytycznych, w porównaniu do zwierząt kontrolnych w tym samym wieku (Lin i Wang, 2014). Zwiększona gęstość kolców tych samych komórek u niedojrzałych zwierząt (P15) została potwierdzona w modelu mysim, mimo że zastosowano iniekcje LPS na późniejszym etapie ciąży (E15) (Fernández de Cossío i in., 2017). Zaobserwowany efekt był zależny od płci, gdyż wystąpił tylko u samców. Co ciekawe, deficyty behawioralne, takie jak zaburzenie zachowań społecznych czy wzrost zachowań powtarzalnych były obecne u dorosłych zwierząt obu płci. Z kolei podanie

dwóch dawek LPS w E15 i E16 w modelu szczurzym wpłynęło na zmiany morfologii neuronów w zależności od wieku i regionu mózgu. Zaobserwowano redukcję gęstości kolców dendrytycznych w neuronach piramidowych warstwy V kory przedczołowej u dorosłych zwierząt (P60), ale nie stwierdzono zmian w warstwie III kory przedczołowej czy w neuronach CA1 i DG hipokampa (Baharnoori i in., 2009). Co ciekawe, autorzy zaobserwowali także różnice w morfologii kolców dendrytycznych, takie jak zredukowana długość kolców oraz zmniejszenie ich powierzchni i objętości, ale zmiany te były przejściowe i występowały jedynie w hipokampie szczurów w wieku P10 (Baharnoori i in., 2009).

Oprócz zmian morfologicznych w różnych modelach MIA wykazano także deficyty funkcjonalne synaps pobudzających i hamujących, które badano m. in. poprzez rejestracje elektrofizjologiczne miniaturowych pobudzających i hamujących prądów postsynaptycznych – odpowiednio mEPSCs (ang. *miniature excitatory postsynaptic currents*) i mIPSCs (ang. *miniature inhibitory postsynaptic currents*) – w skrawkach mózgu gryzoni. W przypadku transmisji pobudzającej w dwóch badaniach wykorzystujących model infekcji wirusowej w E12.5 zaobserwowano spadek częstotliwości mEPSCs w komórkach piramidowych CA1 i kory somatosensorycznej myszy oraz wzrost lub brak różnic w amplitudzie mEPSCs (Coiro i in., 2015; Ito i in., 2010). Z kolei iniekcje poly(I:C) w E15 nie wpłynęły na częstotliwość i amplitudę mEPSCs rejestrowanych z komórek ziarnistych DG u dorosłych myszy (Zhang i van Praag, 2015). Zmniejszona częstotliwość mEPSCs nie wynika prawdopodobnie z zaburzeń presynaptycznych właściwości uwalniania neuroprzekazników, gdyż, z wyjątkiem jednego badania (Oh-Nishi i in., 2010), nie zaobserwowano różnic w presynaptycznych właściwościach uwalniania w żadnym z badanych regionów mózgu (Ito i in., 2010; Patrich i in., 2016) u potomstwa narażonego na MIA. Doniesienia dotyczące funkcji synaps hamujących pochodzą z badań, w których zastosowano indukcję MIA za pomocą poly(I:C) w E9, E12.5 lub E15. Częstotliwość mIPSCs nie uległa zmianie u potomstwa MIA w neuronach kory somatosensorycznej (Coiro i in., 2015), neuronach piramidowych hipokampa (Ito i in., 2010) oraz w komórkach ziarnistych powstałych u dorosłych myszy w hipokampie (Zhang i van Praag, 2015), natomiast była zmniejszona w komórkach ziarnistych pochodzenia embrionalnego (Zhang i van Praag, 2015), neuronach mPFC (Canetta i in., 2016) oraz w obszarach kory somatosensorycznej

(Shin Yim i in., 2017). Amplituda mIPSCs pozostała niezmienną w większości badań dotyczących kory (Canetta i in., 2016; Shin Yim i in., 2017) i hipokampa (Ito i in., 2010; Zhang i van Praag, 2015), chociaż raportowano również jej wzrosty (Coiro i in., 2015). W komórkach piramidowych mPFC zaobserwowano także deficyty hamujących prądów postsynaptycznych wywoływanych stymulacją neuronów parwalbuminowych, a zmiany te wynikały z obniżonego prawdopodobieństwa uwalniania presynaptycznego (Canetta i in., 2016).

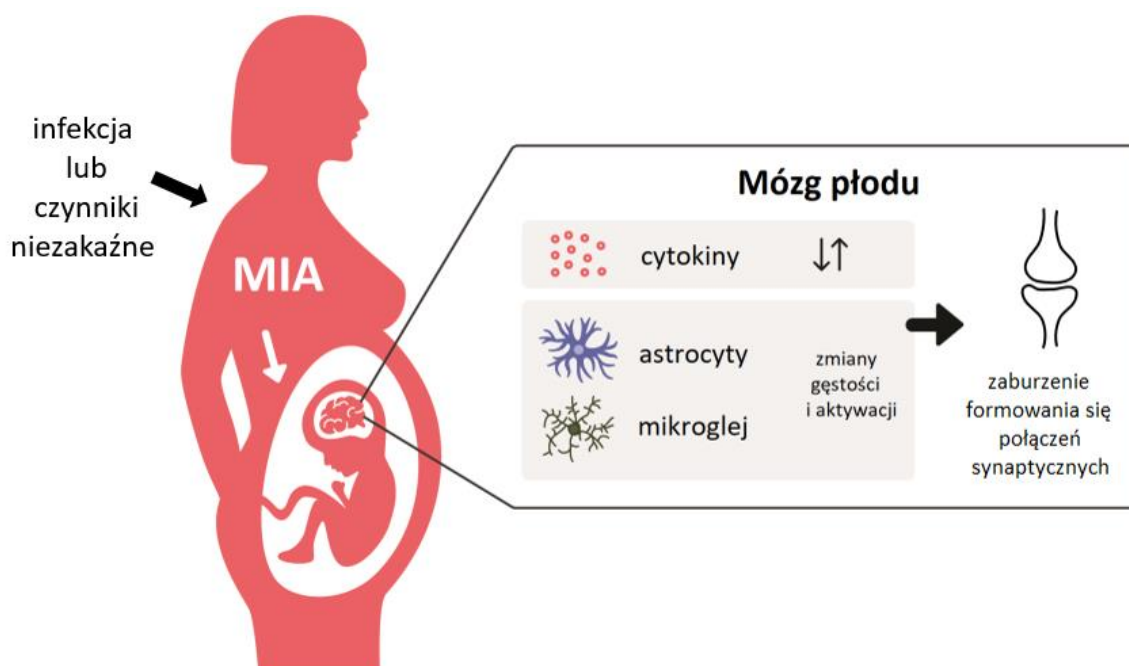
Oprócz zmian w podstawowych właściwościach synaptycznych, kilka badań oceniło jak MIA wpływa na plastyczność synaptyczną. Doniesienia te wykazały, że długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *long-term potentiation*, LTP), będące komórkowym mechanizmem uczenia się i pamięci, jest zmniejszone w neuronach CA1 hipokampa myszy po indukcji MIA za pomocą poly(I:C) w E12.5 (Ito i in., 2010), a także u szczurów, gdy iniekcje wykonano w 15. i 17. dniu ciąży (Oh-Nishi i in., 2010). Wpływ MIA na zmiany długotrwałego osłabienia synaptycznego (ang. *long-term depression*, LTD) w CA1 na różnych etapach rozwoju badano u szczurów po prenatalnym narażeniu na działanie LPS. Redukcja LTD, która zachodzi wraz z dojrzewaniem była znacząco przyspieszona u myszy po MIA (Escobar i in., 2011).

Co zaskakujące, niewiele jest doniesień na temat wpływu MIA na podstawowe właściwości elektrofizjologiczne neuronów, które, oprócz właściwości synaptycznych, są kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania sieci neuronalnych i przetwarzania informacji w mózgu. Po indukcji MIA za pomocą poly(I:C) w E15 wykazano zmniejszoną pobudliwość własną zarówno w hodowanych neuronach hipokampa pochodzących od szczurów P0-P2, jak i w komórkach piramidowych CA1 w skrawkach mózgowych szczurów wieku dwóch tygodni (Patrich i in., 2016). Zmianom tym towarzyszył spadek oporu wejściowego i wzrost adaptacji częstotliwości wyładowań. Z kolei iniekcje LPS w tym samym dniu rozwoju prenatalnego u myszy skutkowały wzrostem pobudliwości komórek piramidowych CA1 u starszych zwierząt (P35) (Griego i in., 2022). W pracy tej wykazano także, że aktywacja układu odpornościowego matki wpływa na pasywne i aktywne własności błony komórkowej neuronów hipokampa – zaobserwowano m.in. wzrost oporu wejściowego, czy wzrost szerokości połówkowej potencjałów czynnościowych u potomstwa MIA.

Wyniki przytoczonych badań wskazują, że aktywacja układu odpornościowego matki może wpływać na kształt i gęstość kolców dendrytycznych, a także na właściwości synaptyczne i pobudliwość neuronów. Kierunek tych zmian jest jednak ściśle związany z zastosowanym protokołem MIA, tzn. czasem indukcji MIA, rodzajem użytej substancji, a także wiekiem zwierząt i badaną strukturą mózgu. Ze względu na znaczną zmienność tych czynników systematyczne porównywanie wyników i wyciąganie wspólnych wniosków jest trudne, co podkreśla potrzebę dalszych, dobrze zaplanowanych badań.

1.5.5. Prawdopodobne mechanizmy leżące u podstaw zaburzeń rozwojowych wywołanych przez MIA

Należy zauważyć, że chociaż powstawanie i dojrzewanie synaps u gryzoni odbywa się przede wszystkim w okresie postnatalnym, aktywacja układu odpornościowego matki w czasie ciąży konsekwentnie prowadzi do zaburzeń struktury i funkcji synaps w modelach MIA. Indukcja układu odpornościowego matki może wpływać na rozwój połączeń nerwowych potomstwa poprzez kilka mechanizmów (Boksa, 2010). Po pierwsze MIA może zaburzać przebieg procesów rozwojowych zachodzących w czasie indukcji matczynego układu odpornościowego, m. in. poprzez wpływ na ekspresję specyficznych białek, czynników troficznych czy neuroprzekaźników, które je regulują. Co więcej, MIA może powodować modyfikacje epigenetyczne w neuronach i komórkach glejowych wpływając na długotrwałe zmiany ekspresji genów, co wpływałoby także na późniejsze procesy zachodzące także w rozwoju postnatalnym (Zhang i Meaney, 2010). Ponadto, MIA może powodować deregulację funkcjonowania układów obwodowych, takich jak układ odpornościowy, które mogą wpływać na funkcję mózgu (Garay i in., 2013; Romero i in., 2007). Co istotne, wiele komponentów układu odpornościowego odgrywa rolę w prawidłowym rozwoju mózgu, a ich nieprawidłowa aktywacja podczas MIA może prowadzić do obserwowanych zmian rozwojowych (Ryc. 2).



Ryc. 2. Prawdopodobne mechanizmy leżące u podstaw zaburzeń rozwojowych wywołanych przez MIA. Układ odpornościowy matki może zostać aktywowany zarówno w odpowiedzi na patogeny, jak i na czynniki niezakaźne (np. choroby autoimmunologiczne). Aktywacja ta, przejawiająca się wzrostem poziomu matczynych cytokin o działaniu pro- i przeciwzapalnym, wpływa na rozwijający się mózg płodu za pośrednictwem łożyska. W efekcie w mózgu płodu dochodzi do: (1) fluktuacji poziomu cytokin pro- i przeciwzapalnych oraz (2) zmian gęstości i aktywacji astrocytów i mikrogleju. Zmodyfikowano z Pekala i in., 2021.

1.5.5.1. Cytokiny

Cytokiny są szeroką grupą cząsteczek sygnałowych, które odgrywają kluczową rolę w układzie odpornościowym, regulując stan zapalny i koordynując odpowiedź immunologiczną w całym organizmie. Białka te są wydzielane także w warunkach fizjologicznych w OUN, gdzie m.in. wpływają na przebieg wielu procesów rozwojowych, takich jak neurogeneza, migracja komórek i ich różnicowanie, formowanie się synaps czy plastyczność synaptyczna (Deverman i Patterson, 2009). Co ważne, niemal wszystkie komórki OUN, w tym neurony, astrocyty i mikrogleje, mogą nie tylko produkować cytokiny, ale również reagować na ich działanie za pośrednictwem odpowiednich receptorów (Hopkins i Rothwell, 1995; Morris i Esiri, 1998). Wzorce ekspresji cytokin i ich receptorów różnią się w zależności od regionu OUN oraz etapu rozwoju (Deverman i Patterson, 2009; Garay i in., 2013). Wiele cytokin zaangażowanych w rozwój układu nerwowego pełni także funkcje immunomodulacyjne. Z tego względu, zaburzenia układu odpornościowego

wywołane infekcją matki mogą znacząco wpływać na procesy rozwojowe kontrolowane przez cytokiny.

W licznych badaniach z wykorzystaniem modeli zwierzęcych infekcji prenatalnej odnotowano podwyższone poziomy cytokin prozapalnych, takich jak interleukina-6 (Il-6), Il-1 β oraz czynnik martwicy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), we krwi matki, łożysku oraz płynie owodniowym po podaniu LPS lub poly(I:C) (Ashdown i in., 2006; Gayle i in., 2004; Gilmore i in., 2005; Girard i in., 2010; Koga i in., 2009; Meyer i in., 2006; Ning i in., 2008; Urakubo i in., 2001). Co istotne, iniekcja rekombinowanej Il-6 u ciężarnych myszy była wystarczająca, aby wywołać deficyty behawioralne przypominające objawy zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa, a jednoczesne podanie przeciwciał przeciwko Il-6 zapobiegło wystąpieniu tych deficytów (Samuelsson i in., 2006; Smith i in., 2007). Cytokiny o działaniu przeciwzapalnym, takie jak Il-10, również ulegają ekspresji w odpowiedzi na MIA, co sugeruje, że aktywacja immunologiczna matki może także uruchomić mechanizmy ochronne (Gayle i in., 2004; Meyer i in., 2006).

Chociaż MIA może prowadzić do zaburzeń behawioralnych u potomstwa, wciąż nie jest jasne, w jaki sposób cytokiny matczyne wpływają na rozwój mózgu płodu. Wykazano, że niektóre cytokiny produkowane w organizmie matki mogą przenikać przez łożysko (Girard i Sebire, 2016; Kent i in., 1994; Zaretsky i in., 2004), ale badania sugerują, że także łożysko i płód mogą samodzielnie produkować cytokiny w odpowiedzi na MIA. W przypadku łożyska wzrost ekspresji cytokin zaobserwowano zarówno w modelach zwierzęcych, jak i w łożysku ludzkim w hodowlach *in vitro* po stymulacji LPS (Gayle i in., 2004; Laham i in., 1996; Simpson i in., 1998). Z kolei zmiany w poziomie cytokin w mózgu płodów gryzoni były różnorodne – zaobserwowano zarówno wzrost, spadek, jak i brak zmian, w zależności od zastosowanego protokołu MIA oraz czasu pomiaru po iniekcji (Ashdown i in., 2006; Gilmore i in., 2005; Golan i in., 2005; Meyer i in., 2006; Ning i in., 2008; Urakubo i in., 2001). Co ciekawe, Meyer i wsp. (2006) wykazali, że podwyższony poziom cytokin prozapalnych w mózgu płodu był związany z równoległym wzrostem ekspresji mRNA odpowiadających im genów tylko wtedy, gdy poly(I:C) podano w późnym (E17/18), a nie wczesnym (E9) okresie ciąży (Meyer i in., 2006). Sugeruje to, że wpływ matczynych i płodowych odpowiedzi immunologicznych na skutki MIA może zależeć od stopnia dojrzałości układu odpornościowego płodu.

Badania na gryzoniach sugerują, że wpływ MIA na ekspresję cytokin u potomstwa może mieć charakter zarówno krótko- jak i długotrwały. Pojedyncza iniekcja poly(I:C) w E12.5 wywołała długotrwałe i specyficzne dla wieku i struktury zmiany w poziomie cytokin w mózgu i surowicy potomstwa, trwające od urodzenia do dorosłości (Garay i in., 2013). Wyniki te są spójne z zaburzeniami poziomu cytokin obserwowanymi u zarówno młodszych jak i dorosłych pacjentów z ASD i schizofrenią. Metaanaliza obejmująca 17 badań wykazała wzrost poziomów kilku cytokin, w tym IL-1 β , IL-6, IL-8 oraz interferonu γ (INF- γ), a także spadek poziomu transformującego czynnika wzrostu β 1 (TGF- β 1) w osoczu i surowicy osób z diagnozą ASD (Masi i in., 2015). Co ciekawe, w kilku badaniach stwierdzono, że wzrost poziomów cytokin u pacjentów z ASD był skorelowany z nasileniem objawów diagnostycznych (AL-Ayadhi i Mostafa, 2012; Ashwood i in., 2008, 2011; Hashim i in., 2013). Zauważono także specyficzne dla regionów zmiany w poziomach cytokin w tkance mózgowej pobranej pośmiertnie od pacjentów z ASD (Vargas i in., 2005). W przypadku schizofrenii, wyniki dwóch metaanaliz wskazują na podwyższone poziomy IL-6, TNF- α oraz IL-1 β we krwi, a IL-6 oraz IL-8 w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z diagnozą schizofrenii w porównaniu do grupy kontrolnej (Gallego i in., 2018; Goldsmith i in., 2016).

1.5.5.2. Mikroglej

Mikroglej należy do komórek glejowych stanowiących pierwszą linię obrony odpornościowej w ośrodkowym układzie nerwowym. W odpowiedzi na infekcję lub urazy mózgu mikroglej wykazuje zdolność do migracji, proliferacji i fagocytozy, produkując jednocześnie szeroki zestaw cytokin, chemokin i innych mediatorów zapalnych (Li i Barres, 2018). Ponadto komórki mikrogleju zasiedlają ośrodkowy układ nerwowy na wczesnych etapach rozwoju i odgrywają istotną rolę w embriogenezie OUN (Ginhoux i in., 2010; Monier i in., 2007). Wykazano, że w okresie prenatalnym mikroglej bierze udział w fagocytozie resztek komórkowych i komórek prekursorowych neuronów, ogranicza wzrost aksonów, a w trakcie rozwoju postnatalnego wpływa na liczbę synaps poprzez promowanie formowania się kolców filopodialnych (Miyamoto i in., 2016; Pont-Lezica i in., 2014; Squarzoni i in., 2014). Jedną z kluczowych funkcji mikrogleju w trakcie rozwoju jest udział tych komórek w eliminacji synaps (Paolicelli i Ferretti, 2017; Schafer i in., 2012; Tremblay i in., 2010).

Biorąc pod uwagę fundamentalną rolę mikrogleju w kształtowaniu sieci synaptycznych oraz utrzymywaniu homeostazy mózgu, komórki te są idealnym kandydatem do roli mediatorów efektów MIA. Rzeczywiście, wiele protokołów MIA prowadziło do zmian gęstości oraz morfologii mikrogleju w różnych regionach mózgu, które obserwowano już na etapie embrionalnym (Wu i in., 2018), krótko po urodzeniu (Li i in., 2014) oraz w dorosłości (Hadar i in., 2017; Van den Eynde i in., 2014; Zhu i in., 2014). Niemniej jednak w innych badaniach różnice te nie zostały wykryte (Corradini i in., 2018; Garay i in., 2013; Giovanoli i in., 2015, 2016). Badania z wykorzystaniem tkanki mózgowej pobranej *post mortem* pokazały zwiększoną gęstość oraz ameboidalną morfologię mikrogleju w różnych obszarach kory oraz mózdzku u pacjentów z ASD (Morgan i in., 2010; Tetreault i in., 2012; Vargas i in., 2005). Ponadto w mózgach tych zaobserwowano nieprawidłową organizację przestrzenną mikrogleju i neuronów, sugerującą wzrost interakcji między tymi komórkami (Morgan i in., 2012). Nieprawidłowości mikrogleju są również powszechne wśród pacjentów ze schizofrenią, u których odnotowano wzrost gęstości tych komórek w obszarach korowych oraz zmiany morfologiczne, sugerujące ich aktywację (Fillman i in., 2013; Radewicz i in., 2000; Wierzbą-Bobrowicz i in., 2005). Także w badaniach obrazowych *in vivo* z wykorzystaniem pozytonowej tomografii emisyjnej (PET), zaobserwowano wzrost aktywacji mikrogleju u pacjentów cierpiących na schizofrenię. Należy jednak zaznaczyć, że nie wszystkie doniesienia są spójne, gdyż w części badań, zarówno z wykorzystaniem tkanki pośmiertnej jak i obrazowania PET, nie wykazano istotnych zmian, lecz rozbieżności te mogą wynikać z różnic w warunkach eksperymentalnych.

1.5.5.3. Astrocyty

Astrocyty stanowią kolejną populację komórek glejowych potencjalnie zaangażowanych w procesy, za pośrednictwem których MIA wpływa na rozwój połączeń nerwowych. Wypustki astrocytów stanowią istotny element wielu synaps w ośrodkowym układzie nerwowym - ocenia się, że około 30% synaps w korze wzrokowej, 60-90% synaps w hipokampie oraz 70-90% synaps w mózdzku jest otoczonych przez wypustki astrocytarne (Chai i in., 2017; Spacek, 1985; Spacek i Harris, 1998; Ventura i Harris, 1999; Xu-Friedman i in., 2001). Zarówno u ludzi jak i u gryzoni, dojrzewanie astrocytów przebiega równolegle z rozwojem synaps i kolców dendrytycznych, co sugeruje ich potencjalny udział w tych procesach. Rzeczywiście, wykazano, że astrocyty wpływają na

formowanie się, dojrzewanie i eliminację synaps, a także morfologię i stabilność kolców dendrytycznych (Allen i in., 2012; Blanco-Suarez i in., 2018; Chung i in., 2013; Nishida i Okabe, 2007). Dodatkowo, czynniki wydzielane przez astrocyty, takie jak adenozyina, D-seryna i TNF- α , modulują siłę synaptyczną oraz plastyczność synaptyczną (Henneberger i in., 2010; Pascual i in., 2005; Stellwagen i Malenka, 2006).

Podobnie jak mikroglej, astrocyty mogą reagować na bodźce zewnętrzne, takie jak uszkodzenie mózgu czy stan zapalny. W warunkach zapalnych komórki te mogą przechodzić w stan astrogliozy (reaktywnej astrocytozy), który cechuje się zmianami na poziomie molekularnym, morfologicznym oraz funkcjonalnym (Sofroniew, 2015). Kilka grup badawczych zaobserwowało zmiany w fenotypie astrocytów, w tym wzrost ekspresji markerów astrocytów, takich jak kwaśne białko włóknkowe gleju (ang. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) i S100B, w różnych regionach mózgu i na różnych etapach rozwoju w odpowiedzi na MIA indukowaną LPS czy IL-6 (Cai i in., 2000; Hao i in., 2010; Rousset i in., 2006; Samuelsson i in., 2006). W przeciwieństwie do tych obserwacji, w kilku badaniach wykorzystujących model MIA wywołany poly(I:C) nie stwierdzono takich zmian (Giovannoli i in., 2015, 2016; Paylor i in., 2016). Dowody wskazujące, że nieprawidłowości astrocytów mogą przyczyniać się do patologii zaburzeń neurorozwojowych u ludzi ograniczają się do kilku doniesień, w których analizowano tkankę mózgową *post mortem*. U pacjentów ze spektrum autyzmu zaobserwowano wzrost ekspresji markerów astrocytów w korze mózgowej i mózdzku (Edmonson i in., 2014; Vargas i in., 2005). Z kolei spadek ekspresji markerów astrocytów w określonych regionach mózgu (Katsel i in., 2011) oraz zmniejszenie gęstości astrocytów GFAP-pozytywnych (Williams i in., 2014) stwierdzono u pacjentów ze schizofrenią.

Podsumowując, liczne badania wskazują na udział cytokin, mikrogleju i astrocytów w patomechanizmie deficytów rozwojowych obserwowanych po MIA. Niemniej jednak, nie można wykluczyć wpływu innych czynników. Przykładowo, stres oksydacyjny (Lanté i in., 2007, 2008), status epigenetyczny (Luoni i in., 2017; Reisinger i in., 2016; Tang i in., 2013) czy modyfikacje mikroflory bakteryjnej (Salia i in., 2025) również zostały zaproponowane jako czynniki wpływające na rozwój mózgu po MIA.

Mimo przekonujących dowodów na istnienie związku między aktywacją układu odpornościowego matki a występowaniem NDDs należy podkreślić, że zdecydowana

większość kobiet, które doświadczają infekcji w czasie ciąży, urodzi zdrowe potomstwo. MIA wydaje się więc działać jako „czynn timer inicjujący” (ang. *disease primer*), prowadząc do zmienionej trajektorii rozwoju mózgu płodu, która w połączeniu z innymi czynnikami środowiskowymi lub genetycznymi może prowadzić do wystąpienia objawów związanych z chorobą w późniejszym życiu (Estes i McAllister, 2016).

1.6. Lipokalina 2

Lipokalina 2 (Lcn2), zwana również lipokalina 2 związaną z żelatynazą neutrofilów (ang. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, NGAL), 24p3, siderokalina, uterokalina oraz białkiem związanym z α_2 -mikroglobuliną (ang. *α_2 -microglobulin-related protein*) jest małym białkiem wydzielanym zewnątrzkomórkowo, należącym do rodziny lipokalin. Ludzka forma białka opisywana jest w literaturze przede wszystkim jako LCN2 lub NGAL, podczas gdy myszy homolog określany jest najczęściej jako Lcn2 i 24p3. W niniejszej pracy obie formy białka będą dla ułatwienia określane jako Lcn2. Rodzina lipokalin to duża i zróżnicowana grupa białek obecnych u różnych gatunków zwierząt, których główną funkcją jest transport niewielkich, hydrofobowych cząsteczek (Flower, 1996). Po raz pierwszy Lcn2 została wyizolowana przez dwa niezależne zespoły badawcze w 1992 i 1993 r. z ludzkich neutrofilów jako 25-kDa białko kowalentnie związane z 92-kDa białkiem żelatynazą B, zwaną również metaloproteinazą macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (ang. *matrix metalloproteinase-9*, MMP-9), która uwolniona z neutrofilów bierze udział w proteolizie macierzy zewnątrzkomórkowej (Kjeldsen i in., 1993; Triebel i in., 1992). Sekwencja nowo wyizolowanego białka nie pasowała do żadnego znanego ludzkiego białka, ale wykazywała wysoki stopień podobieństwa z wydedukowaną wcześniej sekwencją szczurzego białka związanego z α_2 -mikroglobuliną oraz sekwencją RNA mysiego białka 24p3. Wkrótce potem zaobserwowano, że myszy ortolog białka ulega gwałtownej ekspresji w wątrobie (a w mniejszym stopniu także w mózgu i macicy) i jest wydzielany do krwi w odpowiedzi na stan zapalny indukowany terpentyną, identyfikując Lcn2 jako nowe białko ostrej fazy (Liu i Nilsen-Hamilton, 1995). Kolejne badania pokazały, że Lcn2 funkcjonuje jako białko wrodzonej odpowiedzi odpornościowej, które wydzielane w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne wiąże bakteryjne siderofory, tym samym działając jak bakteriostatyk (Flo i in., 2004; Goetz i in., 2002). Obecnie wiadomo, że lipokalina 2 jest wielofunkcyjnym białkiem biorącym udział w szeregu procesów fizjologicznych

i patologicznych, szczególnie we wrodzonej odpowiedzi odpornościowej, transporcie i homeostazie żelaza, regulacji apoptozy i przetrwania komórek, różnych procesach metabolicznych, a także w procesach nowotworowych i uszkodzeniach narządów (Jha i in., 2015).

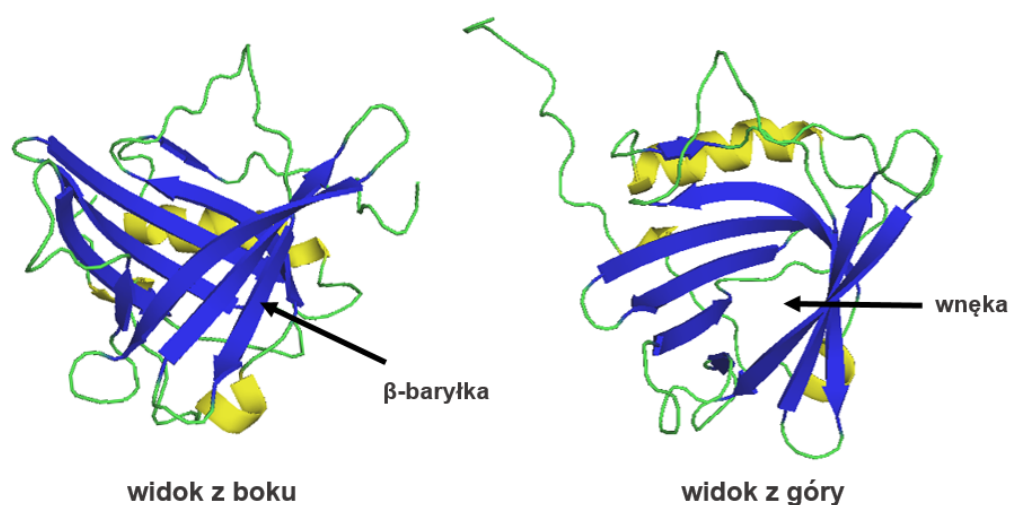
W tkankach obwodowych w warunkach fizjologicznych Lcn2 ulega ekspresji przede wszystkim w szpiku kostnym oraz tkankach podatnych na ekspozycję na patogeny, takich jak m.in. tchawica, płuca, czy żołądek, ale także w wątrobie, tkance tłuszczowej, nerkach, macicy, czy prostaty; zarówno u ludzi jak i gryzoni (Cowland i Borregaard, 1997; Friedl i in., 1999; Garay-Rojas i in., 1996; Huang i in., 1999; Kessel i in., 2023). Co istotne, ekspresja Lcn2 gwałtownie rośnie w odpowiedzi na stan zapalny, infekcje i uszkodzenia tkanek (Elneihoum i in., 1996; Grigoryev i in., 2008; Mishra i in., 2003; Wu i in., 2010; Xu i in., 2015; Zhao i in., 2016). W diagnostyce klinicznej Lcn2 funkcjonuje jako marker ostrego uszkodzenia nerek (Soni i in., 2010), a poziom Lcn2 rośnie także we krwi, moczu i tkance nowotworowej w przebiegu różnych nowotworów (Tyagi i in., 2021; Xu i in., 2020; Yang i in., 2009). Białko to pełni rolę markera prognostycznego w kilku typach zmian nowotworowych (Tyagi i in., 2021; Yang i in., 2009). Lcn2 ulega także ekspresji i pełni ważne funkcje w ośrodkowym układzie nerwowym, co zostanie opisane szerzej w rozdziale 1.6.4.

1.6.1. Budowa Lcn2

Lipokalina 2 jest kodowana przez pojedynczy gen zlokalizowany na chromosomie dziewiątym (u myszy drugim), a jego produktem jest białko zbudowane ze 198 aminokwasów. Mysi odpowiednik Lcn2 wykazuje 62% homologii w sekwencji aminokwasów (Cowland i Borregaard, 1997), jednak struktura przestrzenna obu białek jest bardzo podobna (Jaberi i in., 2021). Na końcu N-terminalnym ludzkiego białka Lcn2 oraz jego mysiego homologu znajduje się 20-aminokwasowy peptyd sygnałowy, który jest odłączany od cząsteczki przed jej uwolnieniem. Obszar ten sąsiaduje z domeną wiążącą ligandy, znaną jako domena lipokaliny. Główną strukturą przestrzenną tej domeny jest wysoce konserwowana β -baryłka (Ryc. 3), zwana często kielichem (ang. *calyx*), stanowiąca sztywne „rusztowanie” cząsteczki, wewnątrz której dochodzi do wiązania ligandów (Flower, 1996; Jaberi i in., 2021). Charakterystyczną cechą budowy Lcn2 jest większa, płyszta i bardziej spolaryzowana wnęka β -baryłki, co umożliwia wiązanie makrocząsteczek

i cząsteczek hydrofilowych, w przeciwieństwie do innych białek z rodziny lipokalin, które wiążą głównie ligandy hydrofobowe (Goetz i in., 2002). W cząsteczce ludzkiej Lcn2 znajduje się również reszta cysteiny Cys87, która uczestniczy w tworzeniu heterodimeru z MMP-9 za pośrednictwem mostku disiarczkowego, co reguluje aktywność enzymatyczną MMP-9 (Tschesche i in., 2001). Częściej jednak Lcn2 występuje w postaci mono- lub homodimeru (Kjeldsen i in., 1993). Z kolei w mysim homologu białka nie występuje wspomniana reszta cysteinowa i brakuje danych na temat występowania mysich heterodimerów Lcn2 i Mmp-9 (Holmes i in., 2005). Badania sugerują, że mysi homolog Lcn2 występuje jedynie w postaci monomeru (Cramer i in., 2012).

Uważa się, że Lcn2, podobnie jak większość białek z rodziny lipokalin, może pełnić swoje funkcje biologiczne poprzez wiązanie się z ligandami, interakcję ze specyficznymi receptorami na powierzchni komórki, lub formowanie kompleksów z rozpuszczalnymi makrocząsteczkami, jak np. kompleks Lcn2 z MMP-9 (Flower, 1996).



Ryc. 3. Struktura przestrzenna ludzkiego białka Lcn2. Widok z boku (po lewej) i z góry (po prawej) na model struktury przestrzennej ludzkiego białka Lcn2. Kolorem granatowym oznaczono β-baryłkę - główną strukturę przestrzenną białek z rodziny lipokalin. W jej wnęce dochodzi do wiązania ligandów. Na podstawie Schröder i in., 2023.

1.6.2. Ligandy dla Lcn2

Początkowo wykazano, że Lcn2 może wiązać się z typowymi dla lipokalin hydrofobowymi ligandami, takimi jak m.in. retinol, kwas retinowy czy kwasy tłuszczowe, np. kwas oleinowy i kwas linolowy, potencjalnie uczestnicząc w transporcie tych cząsteczek (Bao i in., 2015). Znaczącym odkryciem było jednak zidentyfikowanie hydrofilowych ligandów

dla Lcn2 – bakteryjnych sideroforów, które są cząsteczkami chelatującymi jony żelaza, wydzielanymi przez bakterie w celu wychwycenia tego pierwiastka, niezbędnego do ich wzrostu, z organizmu gospodarza (Goetz i in., 2002). W ludzkim ciele dostępność wolnego żelaza jest bardzo ograniczona ze względu na obecność białek wiążących żelazo, takich jak np. transferryna. Siderofory wykazują większe powinowactwo do żelaza niż białka gospodarza, co umożliwia bakteriom wychwytywanie tego pierwiastka. Początkowo Goetz i współpracownicy (2002) w badaniach *in vitro* wykazali, że Lcn2 ma wysokie powinowactwo do enterobaktyny – sideroforu wydzielanego przez *Escherichia coli*, co pozwala Lcn2 rywalizować z tymi patogenami o żelazo, ograniczając tym samym ich wzrost (Goetz i in., 2002). W kolejnych badaniach zaobserwowano, że Lcn2 jest indukowana przez aktywację receptorów TLR, a myszy z delecją genu *Lcn2* narażone na zakażenie *Escherichia coli* są znacznie bardziej podatne na rozwój bakteriemii i zgon w wyniku sepsy (Flo i in., 2004). Następne doniesienia ujawniły, że Lcn2 wiąże także siderofory innych bakterii, potwierdzając jej istotną rolę we wrodzonej odpowiedzi odpornościowej (Flo i in., 2004; Holmes i in., 2005).

Odkrycia kolejnych badaczy sugerowały, że inne funkcje biologiczne Lcn2, niezwiązane z właściwościami bakteriostatycznymi, także są zależne od żelaza (Devireddy i in., 2005; Yang i in., 2002). Biorąc pod uwagę, że białko to nie wiąże się z żelazem bezpośrednio, zaczęto postulować istnienie sideroforów ssaczych, jako ligandów dla Lcn2. W 2010 r. zidentyfikowano grupę prostych katecholi (tj. katechol, 3-metylokatechol, 4-metylokatechol, pirogalol) jako endogennych sideroforów, które wyizolowano w kompleksie z żelazem i Lcn2 z mysiego moczu (Bao i in., 2010), a w kolejnych badaniach zaproponowano, że także 2,3-DHBA (ang. *2,3-dihydroxybenzoic acid*), który w budowie przypomina bakteryjny siderofor enterokalinę, może być potencjalnym ssaczym sideroforem tworzącym kompleksy z Lcn2 (Liu i in., 2014).

1.6.3. Receptory dla Lcn2

Do tej pory zidentyfikowano sześć potencjalnych receptorów dla Lcn2: receptor lipokaliny związanej z żelatynazą neutrofilów (ang. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin receptor*, NGALR), białko związane z receptorem dla lipoprotein o niskiej gęstości 2 (ang. *low density lipoprotein receptor-related protein 2*, LRP2), LRP6 oraz receptory

melanokortyny: receptor melanokortyny 1 (ang. *melanocortin 1 receptor*, MC1R), melanokortyny 3 (MC3R) i melanokortyny 4 (MC4R).

Receptor NGALR, zwany również Lcn2R, 24p3R, SLC22A17 (ang. *solute carrier family 22 member 17*) i BOCT (ang. *brain-type organic cation transporter*) jest białkiem transbłonowym znajdującym się na powierzchni komórki, które podlega konstytutywnej ekspresji w wielu typach komórek w różnych narządach, m.in. w mózgu, nerkach, wątrobie, sercu czy żołądku (Bennett i in., 2011). Nazwa SLC22A17 wskazuje, że receptor ten należy do nadrodziny białek SLC, które transportują szeroką gamę metabolitów i cząsteczek sygnałowych w poprzek błony komórkowej. W obrębie SLC, NGALR należy do rodziny SLC22, która w szczególności transportuje jony organiczne, takie jak mocznik, aminy, kwasy żółciowe i α -ketoglutaran (Pizzagalli i in., 2021). Wykazano, że NGALR uczestniczy w transporcie żelaza, jednak nie wydaje się być odpowiedzialny za transport innych, typowych dla rodziny SLC22 substratów (Bennett i in., 2011; Yang i in., 2002). W badaniu z wykorzystaniem linii komórkowej HeLa dowiedziono, że za pośrednictwem NGALR Lcn2 jest transportowana do wnętrza komórki i może indukować apoptozę lub pobieranie żelaza, w zależności od tego czy występuje w formie związanej z żelazem (holo-Lcn2) czy też nie (apo-Lcn2) (Devireddy i in., 2005). W mózgu NGALR ulega ekspresji w głównie w obrębie istoty szarej, m. in. w korze mózgowej, wzgórzu, a także w mózdzku, a w największym stopniu w hipokampie (Ip i in., 2011). Ekspresję NGALR wykazano przede wszystkim w neuronach, ale niektóre badania wskazują na jego ekspresję także w innych typach komórek, m.in. w astrocytach, mikrogleju i komórkach śródbłonna, zwłaszcza w warunkach patologicznych, np. w modelach stanu zapalnego czy niedokrwienia mózgu (Chia i in., 2015; Jin i in., 2014; Lee i in., 2007, 2009). Co ciekawe, ostatnie badanie wykazało, że za pośrednictwem NGALR Lcn2 może modulować aktywność neuronalną (Yan i in., 2024).

Receptor LRP2 zwany również megaliną, lub gp330 (ang. *glycoprotein 330*) jest dużym, wieloligandowym receptorem błonowym należącym do rodziny receptora lipoprotein o małej gęstości (ang. *low-density lipoprotein receptor*, LDLR) (Spuch i in., 2012). Związanie się liganda z LRP2 początkuje proces endocytozy, za pośrednictwem którego komórka pobiera potrzebne makrocząsteczki do cytoplazmy. Wśród ligandów LRP2 oprócz Lcn2 można wymienić szeroką gamę cząsteczek takich jak lipoproteiny, hormony czy

osoczowe nośniki witamin (Spuch i in., 2012). U ssaków LRP2 ulega ekspresji w wyspecjalizowanych nabłonkach chłonnych, w tym w nerkach, płucach, narządach rozrodczych i mózgu (Christ i in., 2016). W obrębie mózgu LRP2 jest zlokalizowany głównie w ependymocytach wyściełających ścianę komór mózgu, w naczyniach włosowatych oraz splocie naczyniówkowym, ale wykazano jego ekspresję także w neuronach i astrocytach (Ambjørn i in., 2008; Bento-Abreu i in., 2008; Chung i in., 2008; Gomes i in., 2016, 2020; Spuch i in., 2012). Pełni ważne funkcje podczas embriogenezy, zaopatrując płód w składniki odżywcze i kontrolując szlak sygnalizacji Shh (ang. *Sonic hedgehog*), niezbędny do różnicowania się cewy nerwowej (Christ i in., 2016; Fisher i Howie, 2006).

Receptory melanokortyny należą do rodziny receptorów metabotropowych sprzężonych z białkiem G (ang. *G Protein-Coupled Receptor*, GPCR). Receptory te aktywowane są w różnym stopniu przez melanokortyny, do których należy hormon adrenokortykotropowy (ACTH), α -melanokortyna (α -MSH), β -melanokortyna (β -MSH) oraz γ -melanokortyna (γ -MSH) (Moscowitz i in., 2019). Wszystkie receptory melanokortyny są sprzężone z białkiem Gs - związanie się liganda z receptorem powoduje aktywację cykazy adenylowej i wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP (ang. *cyclic adenosine monophosphate*), co z kolei aktywuje kinazę białkową C. W dalszej kolejności dochodzi do napływu zewnątrzkomórkowego wapnia co stymuluje syntezę trifosforanu inozytolu (IP3) i aktywację szlaków MAPK i JAK-STAT (Moscowitz i in., 2019). Spośród receptorów melanokortyny największe powinowactwo do Lcn2 wykazuje receptor MC4R (jednak z 4,5-krotnie mniejszym powinowactwem w porównaniu do α -MSH, jego klasycznego ligandu) (Schröder i in., 2023). MC4R jest zlokalizowany głównie w ośrodkowym układzie nerwowym, a zwłaszcza w podwzgórzu, gdzie zaangażowany jest w regulację spoczynkowej przemiany materii oraz w mPFC, gdzie odgrywa kluczową rolę w regulacji zachowań związanych z przyjmowaniem pokarmu u myszy (Mosialou i in., 2017; Ross i in., 2023; Tao, 2010). Receptor MC4R zlokalizowany jest głównie w neuronach, ale ulega ekspresji także w astrocytach (Caruso i in., 2013).

1.6.4. Lcn2 w OUN

Rosnąca liczba dowodów podkreśla istotne i zróżnicowane role Lcn2 w ośrodkowym układzie nerwowym. Kilka badań wykazało ekspresję Lcn2 w mózgu w warunkach fizjologicznych, choć utrzymuje się ona na stosunkowo niskim poziomie (Chia i in., 2011;

Furukawa i in., 2017; Mucha i in., 2011). U szczurów ekspresję mRNA i białka Lcn2 wykazano w opuszce węchowej, pniu mózgu, mózdzku, podwzgórz i wzgórzu, a także w prążkowi, hipokampie, korze czołowej oraz korze somatosensorycznej, w obrębie astrocytów i komórek nabłonkowych spłotu naczyń i naczyń (Chia i in., 2011). Dalsze dowody na fizjologiczną ekspresję Lcn2 pochodzą z badania transkryptomicznego przeprowadzonego przez Cajigasa i wsp. (2012), w którym wykryto mRNA *Lcn2* wśród transkryptów wyizolowanych z warstwy neuropilu w regionie CA1 hipokampa - obszarze zawierającym dendryty, aksony, komórki glejowe, rzadkie interneurony i naczynia krwionośne (Cajigas i in., 2012). Obecność Lcn2 w OUN badana była jednak przede wszystkim w kontekście różnych zaburzeń neurologicznych, co zostanie opisane w następnym podrozdziale.

1.6.4.1. Funkcje Lcn2 w OUN związane z odpowiedzią odpornościową

Znaczny wzrost poziomu ekspresji Lcn2 w mózgu został szeroko udokumentowany w różnych stanach patologicznych OUN. U ludzi wzrost poziomu Lcn2 wykazano m.in. w tkance mózgowej w przebiegu urazowego i niedokrwiennego uszkodzenia mózgu (Xing i in., 2014; Zhao i in., 2016), nowotworów mózgu (Du i in., 2019) i choroby Alzheimera (Dekens i in., 2018; Naudé i in., 2012), w płynie mózgowo rdzeniowym podczas infekcji OUN (Lin i in., 2024; Platanaki i in., 2023), czy w osoczu w przebiegu udaru niedokrwiennego, urazowego uszkodzenia mózgu i sepsy (Anwaar i in., 1998; Elneihoum i in., 1996; Xing i in., 2014; Zhao i in., 2016). U gryzoni zwiększoną ekspresję Lcn2 w OUN wykazano przede wszystkim w modelach stanu zapalnego i sepsy, niedokrwiennego i urazowego uszkodzenia mózgu, uszkodzenia rdzenia kręgowego, stresu czy drgawek (Behrens i in., 2021; Chia i in., 2011; Hamzic i in., 2013; Ip i in., 2011; Jin i in., 2014; Marques i in., 2008; Mucha i in., 2011; Rathore i in., 2011; Skrzypiec i in., 2013; Xing i in., 2014). Co istotne, Lcn2 jest jednym z najsilniej indukowanych białek w mysim mózgu w modelu infekcji ostrej po dootrzewnowym podaniu wysokiej dawki LPS (Hamzic i in., 2013; Ip i in., 2011; Kang i in., 2018; Marques i in., 2008). Zarówno badania *in vivo* jak i *in vitro* wykazały, że w odpowiedzi na różnorodne bodźce zapalne Lcn2 ulega ekspresji przede wszystkim w astrocytach, mikrogleju i komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, ale także w neuronach (Gravina i in., 2023; Hamzic i in., 2013; Ip i in., 2011; Jin i in., 2014, 2014; Lafon-Cazal i in., 2003; Lee i in., 2007, 2009; Olson i in., 2021; Xing

i in., 2014). Zaobserwowano również indukowany LPS wzrost ekspresji Lcn2 w komórkach nabłonka spłotu naczyńnówkowego oraz następczy wzrost poziomu białka Lcn2 w płynie mózgowo rdzeniowym, sugerując, że Lcn2 może być białkiem ostrej fazy spłotu naczyńnówkowego (Ip i in., 2011; Marques i in., 2008; Olson i in., 2021).

Ekspresja genu *Lcn2* jest regulowana przez wiele powiązanych ze sobą szlaków sygnałowych. Indukowany LPS wzrost ekspresji Lcn2 jest zależny od receptorów TLR4, będących ważnym elementem nieswoistego układu odpornościowego (Flo i in., 2004; Toyonaga i in., 2016). Wykazano także, że cytokiny prozapalne, w tym TNF- α , IL-1 β , IL-3, IL-6 i IL-17 wykazują istotny wpływ na ekspresję i wydzielanie Lcn2 w różnych stanach patologicznych (Devireddy i in., 2001; Lee i in., 2009; Zhang i in., 2014). Czynniki transkrypcyjne takie jak NF- κ B czy C/EBP (ang. *CCAAT/enhancer-binding protein*) odgrywają główną rolę w regulacji transkrypcji genu *Lcn2* (Sunil i in., 2007). Wykazano także, że NF- κ B, będący głównym regulatorem ekspresji genów zapalnych, przyczynia się do przetrwania komórek, poprzez kontrolowanie poboru żelaza za pośrednictwem ekspresji Lcn2 (Iannetti i in., 2008). Co ciekawe, aktywacja NF- κ B w astrocytach we wczesnym okresie życia postnatalnego powodowała globalne zapalenie układu nerwowego, charakteryzujące się silną, specyficzną dla astrocytów ekspresją prozapalnych genów docelowych NF- κ B, wśród których wyróżniono także Lcn2, co w efekcie skutkowało powstaniem wodogłowie i innych wad w rozwoju mózgu (Lattke i in., 2012). Po indukcji transkrypcji genu *Lcn2* następuje synteza i wydzielanie białka Lcn2. Wydzielane białko Lcn2 może oddziaływać na komórki głównie poprzez wiązanie się z receptorami na ich powierzchni na drodze sygnalizacji auto- lub parakrynej, wywierając różnorodne efekty biologiczne w OUN.

Mimo iż początkowo zidentyfikowano Lcn2 jako białko nieswoistej odpowiedzi odpornościowej, które wydzielane pod wpływem infekcji ogranicza wzrost patogenów, wyniki badań dotyczące roli jaką Lcn2 pełni w regulacji układu odpornościowego w mózgu są niejednoznaczne. Profil działania Lcn2 wydzielanej pod wpływem stanów patologicznych OUN może być zarówno prozapalny jak i przeciwzapalny. Liczne badania wskazują, że wzrost ekspresji Lcn2 jest związany z zaostrzeniem odpowiedzi zapalnej co skutkuje pogorszeniem różnych stanów patologicznych. Lee i współpracownicy w 2009 roku wykazali, że Lcn2 zwiększa wrażliwość astrocytów na bodźce cytotoksyczne, indukuje

zmiany morfologiczne w tych komórkach, a także powoduje wzrost ekspresji GFAP (Lee i in., 2009). Cechy te są charakterystyczne dla reaktywnych astrocytów obecnych w przypadku urazów tkanki nerwowej *in vivo* (Wilhelmsson i in., 2006), co może sugerować zaangażowanie Lcn2 w mediowanie procesu astrogliozy (Lee i in., 2009). W kolejnych badaniach zaobserwowano, że Lcn2 może indukować ekspresję chemokin (głównie CXCL10) i cytokin w astrocytach, ale także w mikrogleju, komórkach śródbłonna i neuronach *in vitro* (Lee i in., 2011), a indukowany Lcn2 wzrost ekspresji CXCL10 promował migrację astrocytów, mikrogleju i neuronów (Lee i in., 2011). U myszy z delecją Lcn2 stan zapalny indukowany podaniem LPS skutkował zmniejszeniem liczby komórek aktywowanego mikrogleju i astrocytów w mózgu, a w modelu urazu mózgu u zwierząt tych zaobserwowano obniżoną migrację astrocytów (Jin i in., 2014; Lee i in., 2011). Z kolei *in vitro* brak Lcn2 zmniejszał neurotoksyczność astrocytów stymulowanych LPS (Jin i in., 2014). Obserwacje te sugerują, że Lcn2 pochodząca z gleju może promować neurotoksyczność w warunkach zapalnych.

Także w modelach uszkodzenia rdzenia kręgowego oraz niedokrwienne lub urazowego uszkodzenia mózgu zaobserwowano, że zwiększona ekspresja Lcn2 związana jest z zaostreniem stanu zapalnego oraz efektami neurotoksycznymi (Behrens i in., 2021; Jin i in., 2014; Kim i in., 2023; Li i in., 2023; Liu i in., 2022; Rathore i in., 2011). Co więcej, w modelu indukcji drgawek za pomocą kwasu kainowego wzrost ekspresji Lcn2 w hipokampie skorelowany był z uszkodzeniem bariery krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB), neuroinflamacją i stresem oksydacyjnym, a u myszy z delecją tego genu wykazano zmniejszenie uszkodzenia BBB i zredukowaną neurodegenerację (Shin i in., 2021). Lcn2 odgrywa też znaczącą rolę w patofizjologii bólu neuropatycznego – poprzez indukcję ekspresji cytokin oraz aktywacji mikrogleju przyczynia się do rozwoju nadwrażliwości na ból (Jeon i in., 2013). W patofizjologii choroby Alzheimera Lcn2 jest zaangażowana w sygnalizację prozapalną, uwrażliwia neurony na toksyczność β -amyloidu oraz wpływa na wyciszenie sygnalizacji ochronnej w neuronach (Ferreira i in., 2018; Naudé i in., 2012). Z kolei w eksperymentalnym autoimmunologicznym zapaleniu mózgu i rdzenia (ang. *experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE) będącym zwierzęcym modelem autoimmunologicznych chorób demielinizacyjnych OUN takich jak stwardnienie rozsiane, myszy z delecją Lcn2 charakteryzował złagodzony przebieg choroby, czemu towarzyszyła

zmniejszona infiltracja komórek zapalnych, aktywacja komórek glejowych, ekspresja cytokin zapalnych oraz demielinizacja w rdzeniu kręgowym (Nam i in., 2014).

Należy podkreślić, że także Lcn2 wydzielana w tkankach obwodowych może odgrywać istotną rolę w regulacji odpowiedzi zapalnych w mózgu. Najnowsze badania wskazują, że białko to może przenikać przez BBB (Mosialou i in., 2017; Olson i in., 2021; Petropoulou i in., 2020; Yan i in., 2024), a ponadto wpływa na jej przepuszczalność poprzez naruszenie połączeń ścisłych (ang. *tight junctions*) (Mondal i in., 2020; Wang i in., 2020). W mysich modelach przewlekłych chorób wątroby takich jak niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby i encefalopatia wątrobowa, a także nowotworów tkanek obwodowych wykazano, że lipokalina 2 pochodząca z obwodu może wykazywać działanie neurodegeneracyjne lub neurotoksyczne, a także potęgować stan zapalny układu nerwowego (Adler i in., 2023; Jo i in., 2023; Mondal i in., 2020).

Istnieją również dowody wskazujące na brak wpływu Lcn2 na odpowiedź zapalną lub nawet na jej działanie przeciwzapalne w przebiegu różnych zaburzeń neurologicznych. Kilka badań nie wykazało wpływu Lcn2 na aktywację gleju lub neuroinflamację po stymulacji LPS (Gasterich i in., 2021; Lee i in., 2011; Vichaya i in., 2019). Z kolei w badaniu z 2017 roku Kang i wsp. wykazali, że myszy z delecją Lcn2 charakteryzowały się zwiększoną ekspresją cytokin prozapalnych takich TNF- α i IL-6 w mózgu w odpowiedzi na ogólnoustrojowy stan zapalny wywołany LPS (Kang i in., 2018). Podobne obserwacje przedstawiono w modelu EAE – poziom białka Lcn2 w rdzeniu kręgowym był znacznie podwyższony, jednak mysz pozbawione ekspresji Lcn2 wykazywały zwiększone nasilenie choroby związane ze zwiększoną ekspresją cytokin prozapalnych, co sugeruje, że Lcn2 może odgrywać ochronną rolę w patogenezie EAE (Berard i in., 2012). Z kolei w innym badaniu wykorzystującym zwierzęcy model choroby Alzheimera brak Lcn2 nie wpłynął na poziom aktywacji gleju i patofizjologię choroby (Dekens i in., 2018). Zaobserwowane różnice w działaniu Lcn2 w dobrze ugruntowanych modelach neurozapalnych podkreślają złożoność jej ról i ujawniają luki w naszym obecnym zrozumieniu mechanizmów jej działania.

1.6.4.2. Rola Lcn2 w regulacji morfologii i funkcji neuronów oraz modulowaniu zachowania

Jak wykazano w poprzednim rozdziale Lcn2 odrywa znaczącą rolę immunomodulującą w kontekście różnych patologii OUN, jednak ostatnie doniesienia wskazują, że białko to może być także ważnym regulatorem morfologii i funkcji komórek nerwowych, jak również wpływać na modulowanie zachowania zwierząt.

W 2011 r. Mucha i współpracownicy wykazali, że stres indukuje ekspresję Lcn2 w hipokampie, a u myszy z delecją tego genu zaobserwowano zmiany w morfologii neuronów w tej strukturze w odpowiedzi na stres (Mucha i in., 2011). Wyciszenie genu *Lcn2* u myszy promowało indukowany stresem wzrost gęstości kolców dendrytycznych komórek piramidowych w CA1 oraz wzrost odsetka kolców grzybkowatych, a zmianom tym towarzyszyło nasilenie związanych ze stresem zachowań lękowych. Co ciekawe, u myszy z delecją genu *Lcn2* z grupy kontrolnej również zaobserwowano wzrost gęstości kolców dendrytycznych zarówno w CA1 jak i CA3 oraz wzrost pobudliwości własnej neuronów piramidowych CA1. Podobne zmiany, to jest wzrost gęstości kolców dendrytycznych oraz zwiększoną pobudliwość własną neuronów piramidowych wykazano u myszy z delecją genu *Lcn2* w jądrze podstawno-bocznym ciała migdałowatego (Skrzypiec i in., 2013). W kolejnych badaniach potwierdzono, że brak Lcn2 wpływa na morfologię neuronów w hipokampie, a także powoduje upośledzenie funkcji synaps w postaci zaburzeń LTP (Ferreira i in., 2013). Co istotne, myszy pozbawione ekspresji Lcn2 wykazywały zachowania lękowe i depresyjne, a także upośledzenie funkcji poznawczych, ocenianych w testach uczenia się przestrzennego, co było związane z nadaktywnością osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (Ferreira i in., 2013). Wykazano także, że Lcn2 może zaburzać neurogenezę w zakręcie zębatym hipokampa u osobników dorosłych, co było związane z upośledzeniem zdolności do rozróżniania kontekstu w teście kontekstowego warunkowania strachu (ang. *contextual fear conditioning*) (Ferreira i in., 2018). W niedawnym badaniu wskazano również, że inkubacja pierwotnych hodowli neuronów hipokampalnych z rekombinowanym białkiem Lcn2 powoduje spadek ekspresji podjednostek NR1, NR2A i NR2B receptora NMDA (ang. *N-methyl-D-aspartic acid*) w błonie komórkowej, a także białek postsynaptycznych, takich jak PSD-95 i Homer, a zmianom tym towarzyszy obniżenie LTP, co sugeruje, że białko to może wpływać na

długotrwałą plastyczność synaptyczną (Kim i in., 2024). Wyniki te są spójne z innym badaniem, w którym wykazano, że egzogenna Lcn2 indukuje zmiany strukturalne kolców dendrytycznych, a dokładniej ich zwężenie i wydłużenie (Doliwa i in., 2024).

Co ciekawe, ostatnie doniesienia wskazują, że także lipokalina 2 pochodząca z tkanek obwodowych może wpływać na funkcjonowanie mózgu oraz zachowanie zwierząt. Wykazano, że pochodząca z kości Lcn2 hamuje przyjmowanie pokarmu poprzez oddziaływanie z receptorami MC4R w podwzgórzu (Mosialou i in., 2017). Co więcej, w niedawno opublikowanym badaniu Yan i wsp. (2024) wykorzystując myszy model przewlekłego stresu wykazali, że Lcn2 wydzielana z wątroby w odpowiedzi na stres moduluje aktywność neuronalną w mPFC, co jest związane z indukowanym stresem zachowaniem lękowym (Yan i in., 2024). Odkrycia te mają szczególne znaczenie w kontekście badań klinicznych, które raportują podwyższone stężenia białka Lcn2 w osoczu pacjentów wykazujących objawy lękowe, u pacjentów cierpiących na depresję (szczególnie związaną ze starszym wiekiem oraz przewlekłą niewydolnością serca), a także u pacjentów z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (Choi i in., 2011; Naudé i in., 2013; Yan i in., 2024). Podwyższony poziom Lcn2 w osoczu pacjentów z uszkodzeniem rdzenia kręgowego był także negatywnie skorelowany z funkcjami poznawczymi (Zhang i in., 2023).

Podsumowując, przytoczone dane sugerują, że Lcn2, będąc białkiem związanym z układem odpornościowym, odgrywa istotną rolę w regulacji morfologii i aktywności neuronów oraz komórek glejowych, a także wpływa na zachowanie zwierząt. Wyniki te podkreślają złożoność i różnorodność funkcji pełnionych przez Lcn2, wskazując na potrzebę dalszych badań, które pozwolą lepiej zrozumieć znaczenie tego białka dla funkcjonowania mózgu.

1.6.5. Lcn2 a zaburzenia neurorozwojowe

Mimo, że funkcje białka Lcn2 w dorosłym mózgu są przedmiotem wielu badań, jego rola w rozwoju mózgu pozostaje słabo poznana. Dane na temat ekspresji Lcn2 w rozwijającym się układzie nerwowym ograniczają się do dwóch badań. W 2012 r. Zhang i wsp. za pomocą barwień immunohistochemicznych wykazali ekspresję Lcn2 w ludzkiej tkance nerwowej już na wczesnych etapach życia płodowego, między 17. a 22. tygodniem ciąży,

która utrzymywała się w okresie noworodkowym, przez dojrzewanie aż do dorosłości (Zhang i in., 2012). Autorzy zidentyfikowali komórki z ekspresją Lcn2 jako neurony, a konkretnie komórki gwiaździste w obrębie kresomózgowia i komórki Purkiniego w mózdzku, jednak nie zostało to potwierdzone za pomocą znaczników specyficznych dla typu komórki. W przypadku modeli zwierzęcych zaobserwowano ekspresję Lcn2 w zarodkach ryby z gatunku *Danio pręgowany* (łac. *Danio rerio*) w przodomózgowiu i rdzeniu kręgowym (Lee i in., 2009). Co ciekawe, komórki Lcn2-pozytywne w obrębie rdzenia kręgowego wykazywały także ekspresję białka GFAP i zostały zidentyfikowane jako glej promienisty. Do tej pory nie pokazano ekspresji Lcn2 w rozwijającym się układzie nerwowym u gryzoni w warunkach fizjologicznych; wiadomo jednak, że w modelu mysim Lcn2 jest obecna m. in. w gonadach męskich i żeńskich zarówno pre- jak i postnatalnie, a ekspresja ta jest zależna od płci (De La Chesnaye i in., 2018). Zaobserwowano także ekspresję mRNA *Lcn2* w rozwoju prenatalnym w wątrobie, a jego poziom był modulowany przez dietę matki (Rees i Hay, 2014).

Rola Lcn2 w patogenezie zaburzeń neurorozwojowych nie została dotąd zbadana, jednak kilka doniesień sugeruje, że białko to może być powiązane z NDDs. W przypadku danych z modeli zwierzęcych, poziom Lcn2 był podwyższony w surowicy myszy transgenicznych z obniżoną ekspresją podjednostki NR1 receptora NMDA (ang. *NR1-knockdown*), które wykazują deficyty neurologiczne i zachowania przypominające objawy zaburzeń neurorozwojowych (Wesseling i in., 2014). Wzrost ekspresji Lcn2 zaobserwowano również w hipokampie i pniu mózgu u myszy z mutacją zmiany sensu w genie *Disc1* (ang. *Disrupted in schizophrenia 1*), które wykazują zachowania charakterystyczne dla schizofrenii, takie jak m.in. deficyty hamowania przedimpulsowego (Lipina i in., 2012). Co ciekawe, delecja genu *Lcn2* u myszy z mutacją *Disc1* zredukowała nadmierną gęstość astrocytów oraz znormalizowała zachowanie tych zwierząt. Ponadto w niedawnym badaniu, na podstawie profili transkrypcyjnych mózgu z dwóch mysich modeli wykazujących podwyższoną plastyczność, zidentyfikowano Lcn2 wśród genów potencjalnie związanych z zależną od doświadczenia plastycznością neuronalną (Smith i in., 2017). Na podstawie analizy danych genomowych pochodzących od pacjentów wykazano następnie, że mutacje utraty funkcji (ang. *loss-of-function*, LOF) w genie *Lcn2* mogą zwiększać ryzyko zaburzeń neuroropsychiatrycznych, takich jak padaczka i zaburzenia lękowe. Co więcej, u pacjentów

z deficytami neurorozwojowymi takimi jak autyzm, globalne opóźnienie rozwoju i niepełnosprawność intelektualna zidentyfikowano mutacje (delecje i duplikacje) w regionie genomowym 486,52–703,2 kb, który zawiera gen Lcn2 (na podstawie bazy danych DECIPHER; <https://www.deciphergenomics.org/>). Z kolei w osoczu pacjentów ze schizofrenią odnotowano podwyższone stężenie białka Lcn2 (Wei i in., 2018).

2. Cele pracy

Rosnąca liczba dowodów z badań epidemiologicznych, jak i z doświadczeń na zwierzętach wskazuje, że aktywacja układu odpornościowego matki w ciąży zwiększa ryzyko wystąpienia zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa, jednak mechanizmy leżące u podstaw tych zjawisk wciąż pozostają niewyjaśnione. Zidentyfikowanie białek zaangażowanych w te procesy jest kluczowe dla lepszego zrozumienia patogenezы tych zaburzeń oraz potencjalnego opracowania strategii profilaktycznych czy terapeutycznych. Lcn2 to białko nieswoistej odpowiedzi odpornościowej wydzielane pod wpływem stanu zapalnego, które pełni także ważne funkcje w ośrodkowym układzie nerwowym. Głównym celem niniejszej pracy było **zbadanie udziału białka Lcn2 w procesach leżących u podstaw zaburzeń rozwoju mózgu myszy wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki.**

Aby opracować to zagadnienie sformułowano następujące szczegółowe cele badawcze:

1. Zbadanie ekspresji mRNA *Lcn2* w mózgu na kolejnych etapach rozwoju pre- i postnatalnego.
2. Ocena wpływu wybranego modelu aktywacji układu odpornościowego matki na odpowiedź zapalną oraz ekspresję *Lcn2* w mózgu płodów.
3. Analiza wpływu MIA i delecji genu *Lcn2* na podstawowe właściwości elektrofizjologiczne neuronów, gęstość i morfologię kolców dendrytycznych oraz zachowanie zwierząt.

3. Materiały i metody

3.1. Zwierzęta

W badaniach wykorzystano myszy szczepu dzikiego C57BL/6J pochodzące z hodowli własnej Zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN oraz myszy transgeniczne na tle genetycznym C57BL/6J linii B6.129P2-Lcn2^{tm1Aade}/AkiJ z delecją genu *Lcn2* (ang. *knock-out*, KO), pochodzące z The Jackson Laboratory (nr linii: 024630).

Zwierzęta były hodowane w Zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, gdzie zapewniono im następujące warunki bytowania: 12-godzinny cykl dobowy, temperaturę 20-23°C, wilgotność powietrza w zakresie 45-65%, 10-15 wymian powietrza na godzinę, swobodny dostęp do wody i paszy. Myszy przetrzymywano w klatkach indywidualnie wentylowanych o wymiarach 391 x 199 x 160 mm po 4-5 osobników. Ciężarne samice około 14. dnia ciąży były rozdzielane i trzymane w klatkach pojedynczo, do czasu odsadzenia potomstwa. W przypadku doświadczeń behawioralnych myszy bytowały w klatkach o wymiarach 395 x 346 x 213 mm po 9-14 osobników. Zwierzętom zapewniono ściółkę z włókien drewna topoli oraz wzbogacone środowisko (drewniane bloczki, kołeczki z waty celulozowej, włosy drzewne). Wszystkie badania przeprowadzone na zwierzętach zrealizowano zgodnie z wytycznymi dotyczącymi dobrostanu zwierząt doświadczalnych, a także za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (nr zgody 698/2018).

3.2. Genotypowanie myszy

Aby określić genotyp zwierząt wykorzystywano tkankę pobraną z ogona myszy, z której izolowano genomowe DNA. Tkanekę inkubowano przez noc w temperaturze 55 °C w buforze do lizy (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 0,5% SDS, 1 mM EDTA, proteinaza K 1:10), a następnie przez 10 min w temperaturze 98 °C w celu dezaktywacji proteinazy K. Uzyskany lizat rozcieńczano w wodzie dejonizowanej w stosunku 1:40 i wykorzystywano jako matrycowe DNA. W tabeli 1 przedstawiono sekwencje starterów do reakcji PCR (Genomed). Skład mieszaniny reakcyjnej i przebieg reakcji zaprezentowano odpowiednio w tabeli 2 i tabeli 3.

Starter	Sekwencja 5' -> 3'
LCN_common	TAGGGGATGCCACATCTCA
LCN_mutant	CCTTCTATCGCCTTCTTGACG
LCN_wt	TGACCAGGATGGAGGTGACAT

Tabela 1. Lista starterów do reakcji PCR.

Składnik	Stężenie końcowe	Objętość
GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega)	1x	12,5 µl
starter LCN_common	10 mM	0,5 µl
starter LCN_mutant	10 mM	0,5 µl
starter LCN_wt	10 mM	0,5 µl
ddH ₂ O		9 µl
DNA		2 µl

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej.

Krok	Temperatura (°C)	Czas (sek.)	Uwagi
1.	95	120	
2.	95	30	
3.	65	30	obniżenie temperatury o 0,5°C co każde powtórzenie
4.	72	30	
5.	-	-	powtórzenie kroków 2-4 10x
6.	95	30	
7.	60	30	
8.	72	30	
9.	-	-	powtórzenie kroków 6-8 28x
10.	72	600	
11.	4	-	utrzymanie

Tabela 3. Przebieg reakcji PCR.

3.3. Model aktywacji układu odpornościowego matki

W doświadczeniach zastosowano model aktywacji układu odpornościowego ciężarnych myszy (ang. *maternal immune activation*, MIA) wykorzystujący dootrzewnowe iniekcje roztworu lipopolisacharydu (LPS, składnik zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych). Samice w wieku 10-35 tygodni krzyżowano z samcem na jedną noc. Następnego dnia rano samice ważono oraz sprawdzano obecność czopów waginalnych. Skuteczność krzyżowania oceniano na podstawie przyrostu masy ciała. Ciężarne samice począwszy od 16. dnia ciąży otrzymywały zastrzyki LPS z *Escherichia coli* (O111:B4, Sigma-Aldrich, nr kat. L4391-1MG) rozpuszczonego w roztworze soli fizjologicznej (Injectio Natrii Chlorati Isotonica Polpharma, Polpharma) w stężeniu 5 µg/ml. Zastrzyki były podawane

dootrzewnowo w dawce 50 µg/kg m. c. jednorazową strzykawką 1 ml z igłą 0,5 x 16 mm (KD-JECT III) przez 3 kolejne dni. Myszy kontrolne otrzymywały iniekcje soli fizjologicznej. Potomstwo w różnych stadiach rozwoju (pre- i postnatalnych) zostało następnie wykorzystane do dalszych badań.

3.4. Przygotowanie tkanki mózgowej do analizy ekspresji genów

Myszy w różnych fazach rozwoju postnatalnego (P7, P14, P21, 5-tygodniowe, dorosłe) zostały poddane anestezji wziewnej przy użyciu izofluranu (~5% we wdychanym powietrzu, Vetflurane, Virbac) i eutanazji za pomocą dootrzewnowej iniekcji pentobarbitalu sodu (Morbital, Biowet Puławy) w dawce 50-100 mg/kg masy ciała. Następnie, aby pozbyć się krwi z krwioobiegu, myszy perfundowano poprzez umieszczenie w lewej komorze serca igły 0,5 x 16 mm (KD-JECT III), rozcięcie prawego przedsionka i wpompowanie do serca zimnego zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (ang. *phosphate buffered saline*, PBS, Thermo Fisher Scientific) przy użyciu pompy perystaltycznej BT100S (Lead Fluid).

W przypadku prenatalnych stadiów rozwoju ciężarna samica w 16, 18 lub 19 dniu ciąży została poddana anestezji wziewnej przy użyciu izofluranu (~5% we wdychanym powietrzu, Vetflurane, Virbac) a następnie dekapitacji. W kolejnym kroku płody wyizolowano i umieszczono na lodzie na minimum 2 minuty. Po usunięciu błon płodowych łożysko odcięto i umieszczono w roztworze RNAlater (Invitrogen, nr kat. AM7021), a płody perfundowano zimnym roztworem PBS zgodnie z protokołem opisanym powyżej, z wykorzystaniem igły 0,3 x 13mm (Microlance BD).

Po zakończeniu perfuzji mózgi wypreparowano i umieszczono w roztworze RNAlater. Zarówno mózgi jak i łożyska inkubowano w temperaturze 4°C przez noc. Następnego dnia supernatant został odciągnięty, a mózgi i łożyska zamrożone w temperaturze -70°C do czasu izolacji wybranych struktur mózgu lub izolacji RNA.

3.5. Izolacja RNA

Izolację całkowitego RNA z tkanki mózgowej lub łożyska wykonywano przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, nr kat. 74104). Procedurę przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta. Tkanek homogenizowano w roztworze zawierającym β-merkaptioetanol (2-mercaptoethanol, BioShop, nr kat. MER002) przy użyciu

homogenizatora IKA Ultra-Turrax T8 (IKA). W celu usunięcia genomowego DNA preparaty trawiono DNazą (RNase-Free DNase Set (50), Qiagen, nr kat. 79254). Po zakończeniu procedury stężenie RNA mierzono za pomocą spektrofotometru Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

3.6. Odwrotna transkrypcja i ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono używając zestawu SuperScript IV VILO with ezDNAze (Thermo Fisher Scientific, nr kat. 11766050) zgodnie z zaleceniami producenta. Do badania poziomu ekspresji mRNA wykorzystano sondy TaqMan (TaqMan Gene Expression Assay, Thermo Fisher Scientific, nr kat. 4331182; identyfikatory użytych sond podano w tabeli 4) oraz TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, nr kat. 4444557). Reakcję qPCR przeprowadzono przy użyciu StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Względny poziom ekspresji mRNA obliczono przy użyciu metody komparatywnej $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Wyniki były normalizowane względem genu referencyjnego *Gapdh* (endogenna kontrola).

Gen	Identyfikator sondy
<i>Lcn2</i>	Mm01324470_m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1
<i>Il-1β</i>	Mm00434228_m1
<i>TNF-α</i>	Mm00443258_m1
<i>Il-6</i>	Mm00446190_m1

Tabela 4. Sondy TaqMan wykorzystane do reakcji qPCR.

3.7. Pomiary elektrofizjologiczne na skrawkach mózgu myszy

3.7.1. Przygotowanie skrawków mózgu

Mysz w wieku 5-9 tygodni została poddana anestezji wziewnej za pomocą izofluranu (~5% we wdychanym powietrzu, Vetflurane, Virbac), a następnie uśmiercona przez dekapitację, w celu pobrania mózgu. W dalszej kolejności odcięto mózdzek, a pozostałą część mózgu przyklejono do metalowej podstawki wibratoru Leica VT 1200 S. Tak przygotowany mózg umieszczono w wanience wibratoru wypełnionej schłodzonym (~ 0-1°C) roztworem NMDG (135 mM N-metylo-D-glukamina; 1 mM KCl; 1,2 mM KH₂PO₄; 0,5 mM CaCl₂ x 2 H₂O; 1,5 mM MgCl₂ x 6 H₂O; 20 mM wodorowęglan choliny; 10 mM D-glukozy) natlenowanym karbogenem (mieszanina 5% CO₂ i 95% O₂) i krojono na skrawki o grubości

250 μm w płaszczyźnie czołowej. Otrzymane skrawki umieszczano w komorze inkubacyjnej zawierającej roztwór sztucznego płynu mózgowo rdzeniowego (ang. *artificial cerebrospinal fluid*, ACSF, o składzie: 119 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1 mM NaH_2PO_4 ; 1,3 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; 26 mM NaHCO_3 ; 20 mM D-glukoza; 2,5 mM CaCl_2) natlenowanego karbogenem. Komora znajdowała się w łaźni wodnej utrzymującej stałą temperaturę 31°C. Po 10 minutach komorę umieszczano poza łaźnią, a skrawki inkubowano jeszcze przez co najmniej godzinę w temperaturze pokojowej.

3.7.2. Rejestracja pobudliwości własnej neuronów pola CA1 hipokampa techniką *whole-cell patch-clamp*

Pojedyncze skrawki z widocznym hipokampem umieszczano pod obiektywem mikroskopu w komorze ze stałym przepływem roztworu ACSF o temperaturze 31°C nasyczonego karbogenem. Skrawki unieruchamiano za pomocą harfy do elektrofizjologii. Pole CA1 hipokampa było następnie lokalizowane za pomocą obiektywu suchego o 4-krotnym powiększeniu. Z kolei lokalizacja pojedynczych neuronów piramidowych była przeprowadzana pod obiektywem immersyjnym o 63-krotnym powiększeniu.

Do rejestracji elektrofizjologicznych wykorzystywano elektrody ze szkła borokrzemowego (WPI, nr kat. 1B120F-4) o oporze elektrycznym 4-6 M Ω otrzymywane przy użyciu wyciągarki P-1000 (Sutter Instrument). Jako roztwór wewnątrzkomórkowy stosowano roztwór glukonianu potasu (120 mM K-glukonian; 2 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; 10 mM HEPES; 0,4 mM EGTA; 0,1 mM CaCl_2 ; 2,5 mM $\text{Na}_2\text{-ATP}$; 0,25 mM $\text{Na}_3\text{-GTP}$) o pH 7,1 i osmolarności 290-295 mOsm. Pomiary elektrofizjologiczne były wykonane przy użyciu programu Igor PRO 6.1.2.0 (Wavemetrics) z wykorzystaniem wzmacniacza (npi ELC03XS) i przetwornika analogowo-cyfrowego (ITC-18, InstruTECH/HEKA). Sygnał analogowy był próbkowany z częstotliwością 10 kHz i filtrowany dolnoprzepustowo z częstotliwością 2 kHz. Opór wejściowy (ang. *input resistance*) oraz dostępowy (ang. *series resistance*) były monitorowane przez cały czas trwania nagrań.

Rejestracje elektrofizjologiczne były wykonywane techniką *whole-cell patch-clamp*. W technice tej elektroda rejestrująca znajduje się wewnątrz szklanej pipety, która bezpośrednio styka się z powierzchnią błony komórkowej, tworząc połączenie o bardzo

dużym oporze elektrycznym. Ciągłość błony komórkowej zostaje następnie przzerwana, dzięki czemu możliwa jest rejestracja aktywności elektrycznej całej komórki.

Pomiary pobudliwości własnej komórek nerwowych rejestrowano w trybie stabilizacji prądu (ang. *current clamp*) przy potencjale błonowym utrzymywanym na -60 mV. Neurony stymulowano pulsami prądowymi o czasie trwania 250 ms i natężeniu zwiększającym się o 50 pA w każdym kroku, zaczynając od 50 pA, a kończąc na 600 pA. Dla każdej stymulacji stosowano 3 powtórzenia. Na podstawie otrzymanych wyników dla każdej komórki wykreślono krzywą zależności częstotliwości wyładowań od natężenia zadanego prądu. Parametry potencjałów czynnościowych analizowano dla drugiego potencjału wywołanego prądem o natężeniu 450 pA.

3.8. Badanie kształtu i gęstości kolców dendrytycznych

3.8.1. Przygotowanie mikrocząstek wolframowych pokrytych barwnikiem Dil

Szkiełko podstawowe pokryto cienką warstwą mikrocząstek wolframowych (Tungsten M-20, Bio Rad, nr kat. 1652268), a następnie naniesiono nań zawiesinę barwnika Dil (ThermoFisher Scientific, nr kat. D282) w dichlorometanie (SUPELCO, nr kat. 4-0042). Po wyschnięciu całość zeskrobano, zawieszono w wodzie dejonizowanej i sonikowano przez około pół godziny, do czasu uzyskania jednorodnej zawiesiny. W kolejnym etapie rurkę do sporządzenia naboji (Tefzel, Bio Rad) przepłukano 99,8% alkoholem etylowym i pokryto poliwinylpirolidonem (PVP; Bio Rad, nr kat. 1652440), aby następnie wypełnić ją zawiesiną mikrocząsteczek wolframowych pokrytych barwnikiem Dil. Tak przygotowaną rurkę umieszczono na 30 minut w stacji Tubing Prep Station (BioRad, nr kat. 1652420), umożliwiającej obroty rurki w poziomie wzdłuż własnej osi. Po tym czasie roztwór odciągnięto, a rurkę suszono azotem stosując przepływ 0,1 LPM AIR przez 30 minut, a następnie 0,4 LPM AIR przez 60 minut. Na koniec rurkę pocięto na fragmenty o długości około 1 cm, które wykorzystywano jako naboje do działu genowego.

3.8.2. Przygotowanie skrawków tkanki mózgowej oraz barwienie kolców dendrytycznych

Myszy poddano anestezji wziewnej za pomocą izofluranu (~5% we wdychanym powietrzu, Vetflurane, Virbac), a następnie uśmiercono przez dekapitację, w celu pobrania mózgu. W dalszej kolejności odcięto mózdzek, a prawą półkulę mózgu przez godzinę inkubowano

w 4% roztworze paraformaldehydu (ang. *paraformaldehyd*, PFA, POCH) w temperaturze 4°C. Po tym czasie mózg cięto na skrawki o grubości 140 µm w płaszczyźnie czołowej w zimnym roztworze PBS z wykorzystaniem wibratomu Leica VT1000S (Leica). Następnie skrawki z widocznym hipokampem inkubowano w PBS w temperaturze pokojowej przez co najmniej godzinę, po czym poddawano je procedurze barwienia metodą balistyczną - mikrocząstki wolframowe pokryte barwnikiem Dil wprowadzono do komórek pod ciśnieniem (80 psi, hel) wykorzystując działło genowe (Helios Gene Gun, Bio Rad). Skrawki następnie inkubowano w roztworze PBS przez 2 godziny w temperaturze pokojowej chroniąc przed światłem, a w dalszej kolejności utrwalano poprzez inkubację w 1,5% roztworze PFA w PBS w temperaturze 4°C przez noc. W ostatnim etapie skrawki nakładano na szkiełka podstawowe w kropli medium zatapiającego (Fluoromount-G Mounting Medium) i przykrywano szkiełkami nakrywkowymi.

3.8.3. Obrazowanie mikroskopowe kolców dendrytycznych

Preparaty obrazowano w Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych Instytutu Nenckiego przy użyciu mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM800 Airyscan i obiektywu immersyjnego 63x (olejowy, apochromatyczny 63x/1,4). Serię obrazów zbierano wzdłuż osi Z w odstępach wynoszących 0,3 µm, przy rozdzielczości 1024 x 1024 pxl (wielkość piksela 0,05 µm x 0,05 µm). Do wzbudzenia fluorescencji wykorzystano laser diodowy o długości fali 561 nm. Zbierano obrazy kolców dendrytycznych znajdujących się na dendrytach apikalnych drugo- i trzeciorzędowych komórek piramidowych pola CA1 hipokampa.

3.8.4. Analiza kształtu i gęstości kolców dendrytycznych

Z obrazów uzyskanych za pomocą mikroskopu konfokalnego tworzą maksymalną projekcję w osi Z w programie ImageJ. Tak przetworzone obrazy były następnie wykorzystywane do analizy kształtu i gęstości kolców dendrytycznych przy użyciu programu SpineMagick! (Ruszczycki i in., 2012), pozwalającego na wyznaczenie obrysu kolca dendrytycznego w sposób półautomatyczny. Parametry analizowane przez program obejmowały szerokość główki i długość kolca, stosunek długości kolca do szerokości główki oraz całkowitą powierzchnię kolca, a także gęstość kolców dendrytycznych. Dla każdej komórki analizowano około 150 kolców dendrytycznych z dendrytów drugo- lub

trzeciorzędowych. Zaznaczanie kolców w programie SpineMagick! wykonała mgr Karolina Nader z Pracowni Neurobiologii IBB im. M. Nenckiego PAN.

3.9. Badania behawioralne

Myszy będące potomstwem samic, które w ciąży otrzymywały zastrzyki LPS lub soli fizjologicznej zostały odstawione od matek w wieku 3 tygodni. Następnie, zwierzęta pochodzące z różnych miotów (od 5 do 8 miotów na grupę) zostały połączone w jednej klatce, zgodnie z płcią, genotypem i procedurą eksperymentalną, po 9-14 osobników w klatce. Gdy zwierzęta osiągnęły wiek 8-11 tygodni zostały poddane serii testów behawioralnych obejmujących kolejno badanie zachowań społecznych w klatkach EcoHAB, test zakopywania kulek, test podwyższonego labiryntu krzyżowego, trening apetytywny w klatkach IntelliCage oraz test trójkomorowy. Między kolejnymi testami zachowywano około tygodniowe odstępy.

3.9.1. Badanie zachowań społecznych w klatkach EcoHAB

3.9.1.1. System Eco-HAB

Eco-HAB to w pełni zautomatyzowany i ogólnodostępny (ang. *open source*) system do badania zachowań społecznych myszy żyjących w grupach (Puścian i in., 2016). System składa się z 4 komór z poliwęglanu (30 cm x 30 cm x 18 cm) pokrytych pokrywami ze stali nierdzewnej i połączonych korytarzami w kształcie rur (średnica wewnętrzna 36 mm, średnica zewnętrzna 40 mm; Ryc. 4). W 2 z 4 komór myszy mają dostęp do pożywienia i wody *ad libitum*; pozostałe 2 komory mają wydzieloną przestrzeń pozwalającą na prezentację bodźców węchowych (w rogu, za perforowaną przegrodą). Dostęp do wszystkich przedziałów jest nieograniczony i dobrowolny. Aby rejestrować ruch zwierząt w systemie Eco-HAB, korytarze są wyposażone w okrągłe anteny RFID (ang. *radio frequency-based identification* - identyfikacja oparta na częstotliwości radiowej) odbierające sygnały z podskórnych mikroczipów, zwanych też transponderami. Dane z anten są zbierane przez dedykowany system elektroniczny, który następnie przesyła je do komputera. Wyniki są następnie analizowane przy użyciu biblioteki python pyEcoHAB (<https://github.com/Neuroinflammation/pyEcoHAB>). Eksperymenty przeprowadzono w trzypoziomowym stelażu z 3 oddzielnymi, indywidualnie oświetlonymi systemami Eco-HAB. Stelaż zbudowano z materiałów zapewniających izolację akustyczną od dźwięków

zewnętrznych, a każdy poziom posiada oddzielny system wentylacji. Taka budowa zapewnia prawidłowy przepływ powietrza w każdym systemie Eco-HAB bez mieszania się powietrza potencjalnie przenoszącego zapachy. Dodatkowo, elektroniczne jednostki główne Eco-HAB podłączono do komputerów na zewnątrz szafy, ograniczając w ten sposób kontakt między eksperymentatorem a zwierzętami do minimum.



Ryc. 4. System Eco-HAB.

3.9.1.2. Przebieg eksperymentu w systemie Eco-HAB

Badania w systemie Eco-HAB miały na celu ocenę zachowań społecznych myszy w grupie. Tydzień przed rozpoczęciem eksperymentu zwierzętom wszczepione zostały podskórne transpondery (RFIP Ltd). Procedura odbywała się przy zastosowaniu krótkotrwałego znieczulenia z użyciem izofluranu (Vetflurane, Virbac). Każdy transponder posiadał indywidualny kod (numer) rejestrowany przez anteny za każdym razem, gdy zwierzęta przechodziły obok nich przez korytarze, co umożliwiało zbieranie danych o zachowaniu zwierząt w systemie. Następnie zwierzęta zostały przeniesione do pokoju eksperymentalnego, aby mogły przystosować się do panujących tam warunków. Każda grupa doświadczalna zwierząt stanowiła osobny eksperyment w systemie Eco-HAB.

W dniu rozpoczęcia eksperymentu zwierzęta zostały umieszczone w systemie Eco-HAB wraz z początkiem fazy ciemnej i przebywały tam 6 kolejnych dni, podczas których rejestrowano ich zachowanie za pomocą anten RFID. Eksperyment obejmował fazę adaptacji do klatki (doby 1-2), fazę pomiaru towarzyskości (doby 3-5) oraz fazę prezentacji bodźca węchowego (doba 6). Ostatniego dnia eksperymentu wraz z początkiem fazy ciemnej w jednej z komór zawierającej perforowaną przegrodę umieszczono węchowy bodziec społeczny, czyli ściółkę pochodzącą od nieznanych myszy tego samego szczepu o genotypie dzikim, dopasowanych pod względem płci i wieku. W drugiej komorze z perforowaną przegrodą umieszczono bodziec kontrolny, będący czystą ściółką. Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta wróciły do klatek domowych.

3.9.1.3. Mierzone zachowania i algorytmy przetwarzania danych

W eksperymentach oceniano następujące aspekty behawioralne: skłonność myszy do przebywania z innymi osobnikami (towarzyskość), preferencję zapachu społecznego oraz ogólną aktywność.

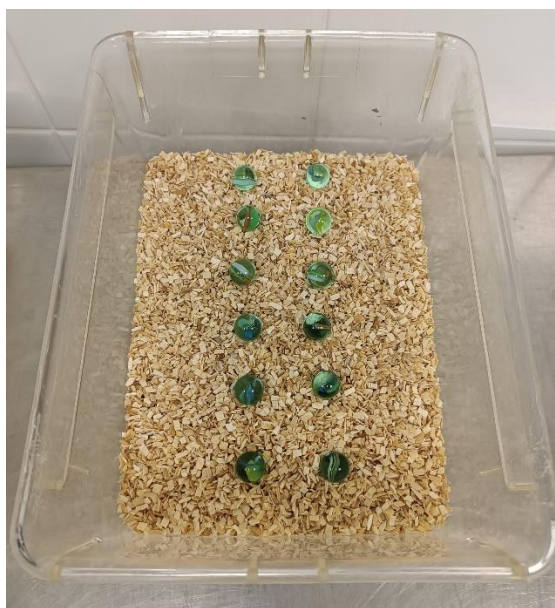
Aby scharakteryzować spontaniczne zachowania społeczne myszy w grupie obliczono towarzyskość, czyli tendencję myszy do dobrowolnego spędzania czasu razem. W pierwszej kolejności dla konkretnej pary badanych myszy, zwierzęcia a i zwierzęcia b, obliczono czas spędzony przez myszy w każdej z czterech komór podczas wybranego eksperymentalnego przedziału czasowego: t_{a1} , t_{a2} , t_{a3} , t_{a4} dla zwierzęcia a oraz t_{b1} , t_{b2} , t_{b3} , t_{b4} dla zwierzęcia b. Następnie obliczono całkowity czas spędzony przez tą parę razem w każdej z klatek: $t_{ab} = t_{ab1} + t_{ab2} + t_{ab3} + t_{ab4}$. Wszystkie czasy zostały znormalizowane przez całkowity czas analizowanego przedziału czasowego, tak aby każda z wielkości mieściła się w przedziale od 0 do 1. Towarzyskość została następnie zdefiniowana jako $t_{ab} - (t_{a1} * t_{b1} + t_{a2} * t_{b2} + t_{a3} * t_{b3} + t_{a4} * t_{b4})$, czyli całkowity czas spędzony razem pomniejszony o czas, który zwierzęta spędziłyby razem zakładając niezależną eksplorację aparatury. Parametr ten został obliczony dla każdej pary zwierząt w ramach danej grupy eksperymentalnej dla 3, 4 i 5 fazy ciemnej. Szczegółowe informacje na temat zaimplementowanych algorytmów można znaleźć w ogólnodostępnym kodzie źródłowym na stronie <https://github.com/Neuroinflab/pyEcoHAB>. Wartości towarzyskości dla poszczególnych myszy obliczono jako średnią ze wszystkich oddziaływań danej myszy (średnia wartość towarzyskości ze wszystkich tworzonych przez nią par).

Kolejnym ocenianym zachowaniem było zainteresowanie myszy zapachowym bodźcem społecznym, które przedstawiono ilościowo jako wskaźnik preferencji zapachu społecznego. W pierwszej kolejności dla każdej myszy obliczono stosunek czasu spędzonego w komorze zawierającej społeczny bodziec węchowy do czasu spędzonego w komorze zawierającej kontrolny bodziec węchowy w ciągu pierwszych 30 minut po prezentacji bodźca. Aby uwzględnić indywidualne preferencje dotyczące spędzania czasu w różnych częściach systemu Eco-HAB, stosunek ten został następnie podzielony przez taki sam stosunek dla analogicznego przedziału czasowego z poprzedniej fazy ciemnej, gdy w przedziałach nie było bodźców węchowych.

Przez cały czas trwania eksperymentu oceniano także aktywność zwierząt, mierzoną jako całkowitą liczbę wizyt we wszystkich komorach Eco-HAB w danym przedziale czasowym.

3.9.2. Test zakopywania kulek

Test zakopywania kulek jest często stosowany w celu oceny wystąpienia zachowań powtarzalnych i kompulsywnych. Pół godziny przed rozpoczęciem testu myszy zostały przeniesione do pokoju behawioralnego w celu aklimatyzacji do warunków panujących w pomieszczeniu. Podczas doświadczenia myszy były testowane pojedynczo. Każda mysz została umieszczona w przezroczystej klatce plastikowej (27 x 21 x 14 cm) wypełnionej ściółką na grubość około 5 cm, na której umieszczono 12 szklanych kulek o średnicy 15 mm, rozmieszczonych równomiernie w dwóch rzędach (Ryc. 5). Klatka ta była przykryta drugą przezroczystą klatką plastikową o takich samych wymiarach. Myszy były obserwowane przez eksperymentatora przez cały czas trwania testu. Po upływie 15 min mysz wracała do swojej klatki domowej. W trakcie testu mierzono liczbę zakopanych kulek, czyli kulek przykrytych ściółką w 2/3 lub więcej.



Ryc. 5. Test zakopywania kulek

3.9.3. Test podwyższonego labiryntu krzyżowego

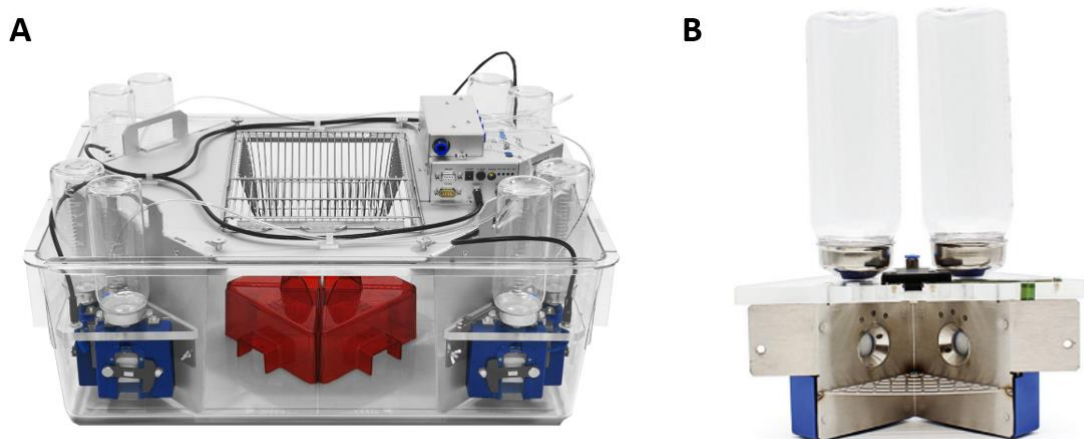
Test podwyższonego labiryntu krzyżowego jest powszechnie używanym modelem do badania zaburzeń lękowych, wykorzystujący naturalną awersję gryzoni do eksplorowania otwartych i wysoko położonych przestrzeni (Walf i Frye, 2007). Test został przeprowadzony przy użyciu podwyższonego labiryntu krzyżowego zbudowanego z czterech ramion o wymiarach 30 x 6 cm, ułożonych w kształt krzyża i zamontowanych na stojaku o wysokości 60 cm. Dwa ramiona umieszczone naprzeciwko siebie posiadały ścianki o wysokości 17 cm (ramiona zamknięte), a dwa pozostałe były pozbawione ścianek (ramiona otwarte). W dniu doświadczenia, pół godziny przed rozpoczęciem testu, myszy zostały przeniesione do pokoju behawioralnego w celu aklimatyzacji do warunków panujących w pomieszczeniu. Podczas doświadczenia myszy były testowane pojedynczo. Test rozpoczynał się od umieszczenia myszy na skrzyżowaniu ramion otwartych i zamkniętych, głową skierowaną do ramienia otwartego. Aktywność myszy była rejestrowana za pomocą kamery podłączonej do komputera, z wykorzystaniem oprogramowania EthoVision XT wersja 14.0 (Noldus Information Technology, Holandia). Po upływie 5 minut mysz wracała do swojej klatki domowej. Nagrania były analizowane przy użyciu oprogramowania EthoVision XT umożliwiającego automatyczne śledzenie zwierzęcia na nagraniu. Analizowano ilość wejść myszy do ramienia otwartego, czas przebywania w ramieniu otwartym oraz liczbę niechronionych wychyleń pyszczka, czyli

takich w których środek ciała zwierzęcia znajdował w obrębie ramion otwartych, a pyszczek wychylał się poza granice ramion otwartych w kierunku podłogi.

3.9.4. Trening apetytywny w klatce IntelliCage

3.9.4.1. System IntelliCage

IntelliCage to zautomatyzowany system umożliwiający badanie zachowania zwierząt żyjących w grupach (Knapska i in., 2006, 2013). IntelliCage zbudowany jest z klatki hodowlanej o wymiarach 55 × 37,5 × 20,5 cm, w której umieszczone są cztery rogi doświadczalne (Ryc. 6A). Konstrukcja każdego rogu eksperymentalnego przypomina metalowy graniastosłup o podstawie w kształcie trójkąta (Ryc. 6B). Każdy róg zawiera elementy mechaniczne i jest połączony z panelem sterującym podłączonym do komputera z wykorzystaniem oprogramowania IntelliCagePlus 3.3.7.0 (TSE Systems, Niemcy). Wejście do rogu doświadczalnego jest ograniczone rurką o średnicy 3 cm, co pozwala na dostęp do rogu tylko jednej myszy. Nad wejściem umieszczony jest czujnik temperatury, który wykrywa obecność zwierzęcia oraz antena rejestrująca sygnały z transponderów, umożliwiających rozpoznawanie poszczególnych myszy. Wewnątrz rogu eksperymentalnego, za ruchomymi drzwiczkami, znajdują się dwie butelki z wodą (do każdej butelki prowadzą osobne drzwiczki). Otwarcie drzwiczek i dostęp do butelek są możliwe po wykonaniu instrumentalnej reakcji, polegającej na puknięciu drzwiczek nosem.



Ryc. 6. Budowa klatki IntelliCage. A Zdjęcie klatki IntelliCage. **B** Budowa rogu eksperymentalnego. <https://www.tse-systems.com/products/intellicage/>

3.9.4.2. Trening apetytywny rozróżniania położenia butelek zawierających wodę lub roztwór cukru w klatce IntelliCage

Celem treningu przeprowadzonego w klatce IntelliCage było wytworzenie preferencji do butelki zawierającej 10% roztwór sacharozy w wodzie, będący bodźcem apetytywnym, czyli nacechowanym pozytywnie. Tydzień przed rozpoczęciem eksperymentu zwierzętom zostały wszczepione podskórne transpondery (DataMars) przy zastosowaniu krótkiej narkozy z użyciem izofluranu (Vetflurane, Virbac). Każdy transponder posiadał indywidualny numer, rozpoznawany przez klatkę IntelliCage. Następnie zwierzęta zostały przeniesione do pokoju eksperymentalnego, aby mogły przystosować się do panujących tam warunków. W dniu rozpoczęcia eksperymentu myszy zostały umieszczone w klatce IntelliCage wraz z początkiem fazy ciemnej. Doświadczenie rozpoczynało się od dwudniowego okresu adaptacji do klatki, podczas którego drzwiczki do butelek były stale otwarte a zwierzęta miały swobodny dostęp do wszystkich rogów. Następnie drzwiczki do butelek zostały zamknięte i przez kolejne dwa dni zwierzęta uczyły się zdobywania dostępu do wody poprzez wykonanie prawidłowej reakcji instrumentalnej, polegającej na puknięciu drzwiczek nosem, co skutkowało otwarciem drzwiczek. Drzwiczki zamykały się po 5 sekundach od otwarcia. Na koniec tej sesji dla każdej myszy wybrano róg najmniej preferowany, to znaczy z najmniejszą liczbą wizyt. W następnym trzydniowym etapie dostęp do wody został ograniczony do rogu najmniej preferowanego. W trakcie tego etapu rejestrowano reakcje instrumentalne wykonywane w tym rogu do obu butelek. Następnie butelka, do której zwierzęta wykonywały mniejszą liczbę reakcji, była zastępowana butelką zawierającą 10% roztwór cukru (sacharozy), do którego zwierzęta miały dostęp przez kolejne 5 dni. Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta wracały do klatki domowej.

3.9.5. Test trójkomorowy

Test trójkomorowy jest powszechnie używany do badania zaburzeń w zachowaniu społecznym zwierząt. Test odbywał się w nieprzezroczystej klatce o wymiarach 63 x 44 x 25 cm podzielonej na 3 równe części (21 x 44 x 25 cm). W ścianach dzielących komory znajdowały się otwory, przez które badana mysz miała wolny dostęp do wszystkich obszarów klatki. W obu skrajnych komorach klatki, w ich środkowych częściach, umieszczono metalowe koszyczki w kształcie walca (wys. 15 cm, śr. 12 cm) odwrócone do

góry dnem. W dniu doświadczenia, godzinę przed rozpoczęciem testu, myszy zostały przeniesione do pokoju behawioralnego w celu aklimatyzacji do warunków panujących w pomieszczeniu. Zwierzęta były testowane pojedynczo. Test składał się z dwóch następujących po sobie faz, trwających po 10 min każda. Pierwszą fazą była habituacja, podczas której metalowe koszyczki w obu komorach były puste. W tym etapie mysz została umieszczona w środkowej komorze i miała możliwość swobodnej eksploracji całej klatki. W drugiej fazie testu pod jednym z koszyczków umieszczono bodziec kontrolny w postaci czystej ściółki, a pod drugim bodziec społeczny w postaci ściółki pochodzącej od nieznanych myszy tego samego szczepu o genotypie dzikim, dopasowanych pod względem wieku i płci do myszy badanych. Zachowanie zwierząt było rejestrowane za pomocą kamery podłączonej do komputera, z użyciem oprogramowania EthoVision XT. Po zakończeniu testu mysz powracała do swojej klatki domowej. Nagrania analizowano za pomocą oprogramowania EthoVision XT umożliwiającego automatyczne śledzenie zachowania myszy. Głównym parametrem podlegającym ocenie był czas interakcji myszy z koszyczkami (dotykanie koszyczka pyszczkiem, węszenie, wspinanie się). Wskaźnik preferencji zapachu społecznego został następnie obliczony według wzoru $IS = (TS - TNS) / (TS + TNS)$, gdzie IS – wskaźnik preferencji zapachu społecznego, TS – czas spędzony na interakcji z koszyczkiem z bodźcem społecznym, TN – czas spędzony na interakcji z koszyczkiem z bodźcem kontrolnym.

3.10. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software). Normalność rozkładów danych określano za pomocą testu D'Agostino-Pearsona. W przypadku, gdy rozkład danych nie był normalny dane poddawano przekształceniu logarytmicznemu $Y = \ln(Y)$ lub – w przypadku występowania wartości zerowych – $Y = \ln(Y+1)$. Dla porównań więcej niż dwóch grup w przypadku danych o rozkładzie normalnym zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), dwuczynnikową analizę wariancji, dwuczynnikową analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami lub trójczynnikową analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami; z testem *post hoc* Tukey'a lub Sidaka. Jeśli przekształcenie logarytmiczne nie skutkowało normalizacją danych stosowano testy nieparametryczne: dla porównań dwóch grup zastosowano test Manna-Whitney'a, a dla porównań czterech grup zastosowano analizę wariancji ART (ang.

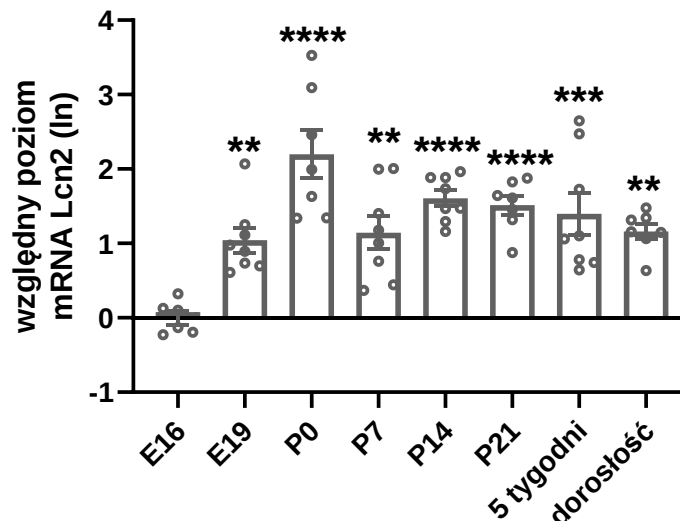
Aligned Rank Transform ANOVA, Wobrock et al. 2011) z testem *post hoc* Tukey'a. Dane dotyczące przeżywalności płodów analizowano testem chi-kwadrat (χ^2).

Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinach jako średnie wszystkich pomiarów dla danych grup doświadczalnych wraz z odchyleniami w postaci błędu standardowego średniej (ang. *standard error of the mean*, SEM). Dane dotyczące wielkości grup umieszczono w opisach rycin.

4. Wyniki

4.1. Analiza ekspresji mRNA *Lcn2* w trakcie rozwoju mózgu

Ekspresja i funkcje białka *Lcn2* w dorosłym mózgu były przedmiotem wielu badań (Chia i in., 2011; Ferreira i in., 2013; Ip i in., 2011; Mucha i in., 2011; Yan i in., 2024). Niewiele natomiast wiadomo o roli *Lcn2* w trakcie rozwoju mózgu. Aby scharakteryzować profil ekspresji mRNA *Lcn2* w mózgu podczas rozwoju przeprowadzono reakcję RT-qPCR z wykorzystaniem RNA wyizolowanego z hipokampów myszy szczepu dzikiego C57BL/6J obu płci na różnych etapach rozwoju pre- i postnatalnego (od płodów E16 do osobników dojrzałych, dwumiesięcznych). Ze względu na brak rozkładu normalnego uzyskanych danych zastosowano transformację logarytmiczną $Y = \ln(Y)$. Zaobserwowano, że ekspresja mRNA *Lcn2* w hipokampie rozpoczyna się już w rozwoju prenatalnym i jest obecna na wszystkich badanych etapach rozwoju (Ryc. 7). Jednoczynnikowa analiza wariancji wykazała, że poziom ekspresji *Lcn2* różni się, w zależności od wieku zwierzęcia ($F(7, 51) = 8,517$, $p < 0,0001$). Najniższy poziom mRNA *Lcn2* zaobserwowano w hipokampach płodów E16 - analiza testem *post hoc* Tukey'a wykazała istotny wzrost ekspresji *Lcn2* w kolejnych etapach rozwoju (E16 vs. E19 $p = 0,0182$, E16 vs. P0 $p < 0,0001$, E16 vs. P7 $p = 0,0068$, E16 vs. P14 $p < 0,0001$, E16 vs. P21 $p = 0,0002$, E16 vs. 5 tygodni $p = 0,0004$, E16 vs. dorosłość $p = 0,0080$; Ryc. 7). Poziom mRNA *Lcn2* wzrastał do momentu narodzin (P0), w którym osiągnął wartość maksymalną, jednak istotne statystycznie różnice zaobserwowano tylko w porównaniu do hipokampów myszy E16 (P0 vs. E16 $p < 0,000$, Ryc. 7), E19 (P0 vs. E19 $p = 0,0036$; nie zaznaczono na wykresie), P7 (P0 vs. P7 $p = 0,0106$; nie zaznaczono na wykresie) i dorosłych (P0 vs. dorosłość $p = 0,0177$; nie zaznaczono na wykresie). W okresie postnatalnym ekspresja *Lcn2* utrzymywała się na podobnym poziomie do dorosłości.



Ryc. 7. Charakterystyka ekspresji mRNA *Lcn2* w hipokampie w rozwoju pre- i postnatalnym myszy. Dane zostały poddane przekształceniu logarymicznemu $Y = \ln(Y)$. Uzyskane wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, E16 n=6, E19 n=8, P0 n=7, P7 n=8, P14 n=8, P21 n=7, 5 tygodni n=8, dorosłość n=7. Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji z testem *post hoc* Tukey'a. Gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

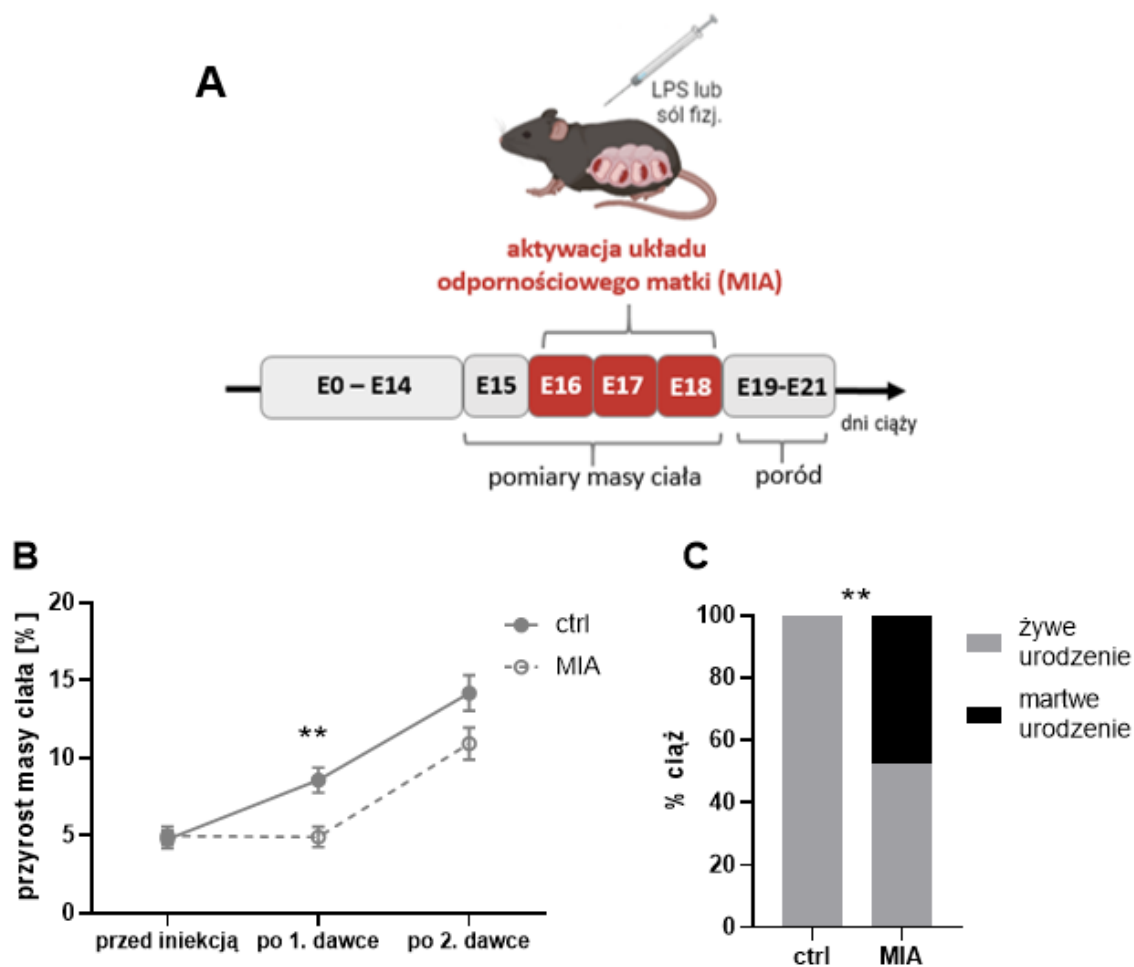
4.2. Charakterystyka zwierzęcego modelu aktywacji układu odpornościowego matki (MIA)

Aby odpowiedzieć na pytanie w jaki sposób aktywacja układu odpornościowego matki (MIA) wpływa na rozwój mózgu potomstwa i czy *Lcn2* bierze udział w tych procesach należało wybrać odpowiedni model badawczy. W niniejszej pracy wykorzystano szeroko stosowany model aktywacji układu odpornościowego matki, w którym ciężarne myszy otrzymywały iniekcje roztworu lipopolisacharydu (LPS), który imituje infekcję bakteryjną. W doświadczeniu ciężarne myszy począwszy od 16. dnia ciąży, przez 3 kolejne dni, otrzymywały dootrzewnowe zastrzyki LPS z *Escherichia coli* rozpuszczonego w soli fizjologicznej w dawce 50 $\mu\text{g/kg}$ m. c.. Myszy kontrolne otrzymywały iniekcje soli fizjologicznej. Charakterystykę modelu przeprowadzono na myszach szczepu dzikiego C57BL/6J.

4.2.1. Wpływ MIA na przyrost masy ciała ciężarnych samic oraz przeżywalność płodów

Aby ocenić w jaki sposób wybrany model MIA wpływa na przebieg ciąży przeprowadzono pomiary przyrostu masy ciała ciężarnych samic, które otrzymywały iniekcje soli fizjologicznej lub LPS. Ciężarne samice ważono codziennie rano, począwszy od dnia poprzedzającego pierwszą iniekcję (E15), do dnia ostatniej iniekcji (E18) (Ryc. 8A).

Następnie porównywano procentowy przyrost masy ciała samic względem masy ciała z dnia E15. W analizie statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami, uwzględniając czynnik procedury (ctrl – myszy otrzymujące w ciąży iniekcje soli fizjologicznej i MIA - myszy otrzymujące w ciąży iniekcje LPS) oraz czasu (przed iniekcją, po 1. dawce, po 2. dawce), która wykazała istotność czynnika procedury ($F(1, 20) = 4,939, p=0,0379$), czasu ($F(1, 437, 28,75) = 114,6, p<0,0001$), a także interakcji między czynnikami ($F(2, 40) = 8,147, p=0,0011$). W teście *post hoc* Siadaka stwierdzono istotny statycznie spadek przyrostu masy ciała ciężarnych myszy po pierwszej iniekcji LPS w porównaniu do samic kontrolnych, które otrzymały iniekcję soli fizjologicznej (po 1. dawce - ctrl vs. MIA: $p=0,0068$, Ryc. 8B). Zaobserwowany efekt był przejściowy, gdyż nie wykazano istotnych różnic w przyroście masy ciała po drugiej iniekcji (po 2. dawce E18 - ctrl vs. MIA: $p=0,1397$, Ryc. 8B). Iniekcje LPS istotnie wpływały także na przeżywalność płodów – prawie 50% cięż samic otrzymujących iniekcje LPS kończyło się martwym urodzeniem (test χ^2 , ctrl vs. MIA: $p=0,0058$, Ryc. 8C).

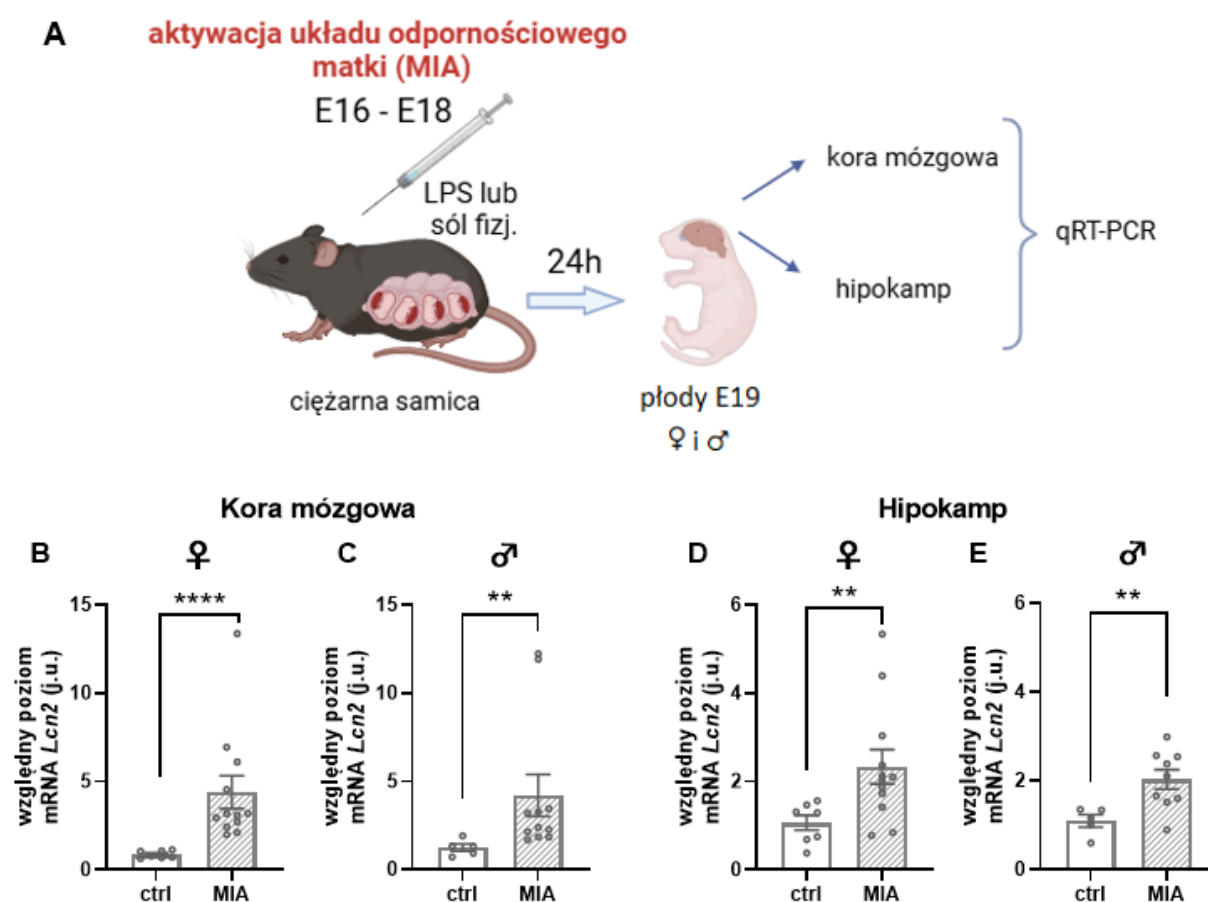


Ryc. 8. Wpływ MIA na przyrost masy ciała ciężarnych samic i przeżywalność płodów.
A Schemat eksperymentu. Opis w tekście. **B** Procentowy przyrost masy ciała ciężarnych samic względem masy ciała z dnia przed iniekcją (E15). Dane przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, WT ctrl $n=11$, WT MIA $n=12$. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami i testem *post hoc* Sidaka. Gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami: $**p<0,01$. **C** Przeżywalność płodów przedstawiona jako procent ciąż zakończonych żywym lub martwym urodzeniem. WT ctrl $n=11$, WT MIA $n=21$. Zastosowano test χ^2 , gwiazdkami oznaczono poziom istotności między grupami: $**p<0,01$.

4.2.2. Wpływ MIA na ekspresję mRNA *Lcn2* w mózgu w rozwoju prenatalnym

Ponieważ obecność mRNA *Lcn2* wykazano w hipokampie już w okresie prenatalnym, postanowiono zbadać czy podanie LPS w ciąży wpłynie na zmiany ekspresji tego genu na tak wczesnym etapie rozwoju potomstwa. W tym celu przeprowadzono reakcję RT-qPCR wykorzystując RNA wyizolowane z kory mózgowej i hipokampów płodów obu płci, pobranych od matek szczepu dzikiego C57BL/6J po upływie 24 godzin od ostatniej iniekcji soli fizjologicznej lub LPS (Ryc. 9A). Zaobserwowano, że aktywacja układu odpornościowego matki spowodowała znaczący wzrost ekspresji mRNA *Lcn2* zarówno

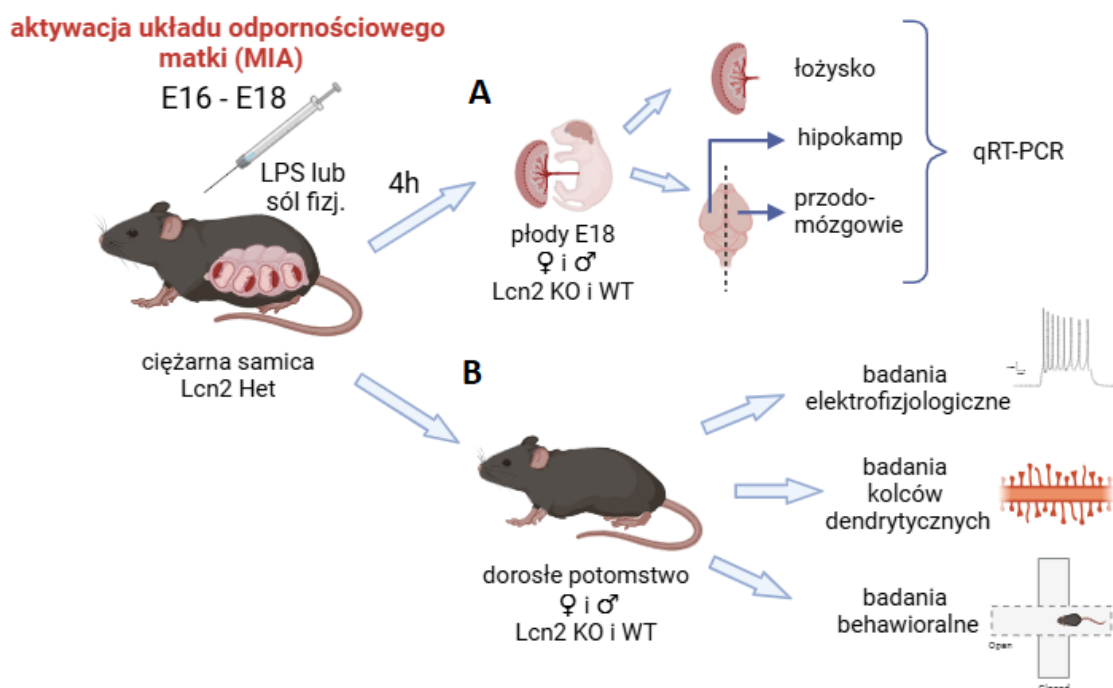
w korze mózgowej (Ryc. 9B, C) jak i hipokampie (Ryc. 9D, E) u płodów obu płci w porównaniu do grupy kontrolnej (test Mann’a-Whitney’a, kora mózgowa: samice - $p < 0,0001$, samce - $p = 0,0032$; hipokamp: samice - $p = 0,0095$, samce - $p = 0,0037$). Należy również zauważyć, że średni wzrost ekspresji mRNA *Lcn2* był wyższy w korze mózgowej (samice: ctrl $0,87 \pm 0,08$ vs. MIA $4,39 \pm 0,93$, samce: $1,26 \pm 0,20$ vs. MIA $4,22 \pm 1,18$) niż w hipokampie (samice: ctrl $1,07 \pm 0,17$ vs. MIA $2,34 \pm 0,39$; samce: ctrl $1,09 \pm 0,14$ vs. MIA $2,03 \pm 0,22$).



Ryc. 9. Wpływ MIA na poziom ekspresji mRNA *Lcn2* w korze mózgowej i hipokampie płodów myszy obu płci w rozwoju prenatalnym. A Schemat eksperymentu. Opis w tekście. B, C Poziom ekspresji mRNA *Lcn2* w korze mózgowej samic (B) i samców (C) 24 godziny po ostatniej iniekcji soli fizjologicznej lub LPS. D, E Poziom ekspresji mRNA *Lcn2* w hipokampie samic (D) i samców (E) 24 godziny po ostatniej iniekcji soli fizjologicznej lub LPS. Dane przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, samice: ctrl $n = 7$, MIA $n = 12$, samce: ctrl $n = 5$, MIA $n = 11$. Zastosowano test Manna – Whitney’a, gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

4.3. Wpływ MIA i delecji genu *Lcn2* na odpowiedź zapalną w mózgu, funkcję i morfologię neuronów hipokampa oraz zachowanie zwierząt

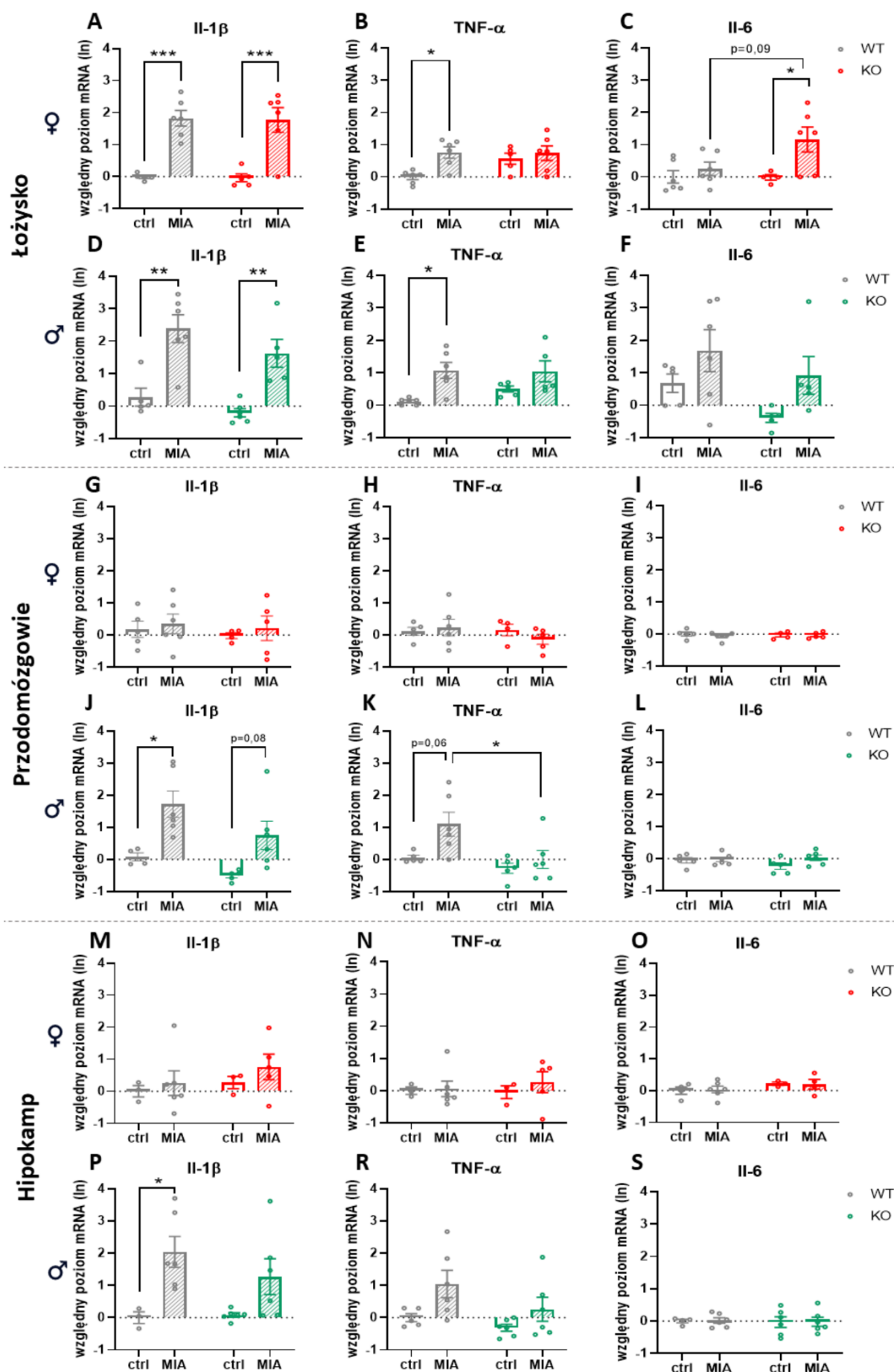
Ekspresja *Lcn2* zostaje zwiększona w mózgu płodów w odpowiedzi na aktywację układu odpornościowego matki z użyciem LPS (Ryc. 9B-E), co sugeruje, że białko to może być zaangażowane w regulację odpowiedzi zapalnej indukowanej MIA. Aby zbadać, w jaki sposób infekcja w ciąży wpływa na rozwój mózgu i czy *Lcn2* odgrywa rolę w tym procesie wykorzystano model MIA oparty na zwierzętach transgenicznym z delecją genu *Lcn2* (ang. *knock-out*, KO). Heterozygotyczne samice (*Lcn2* Het) krzyżowano z samcami, a następnie ciężarne samice poddawano iniekcjom LPS lub soli fizjologicznej. W ten sposób otrzymano potomstwo z delecją genu *Lcn2* (KO) oraz potomstwo o niezmienionym genotypie (ang. *wild type*, WT), które wykorzystano do dalszych badań (Ryc. 10).



Ryc. 10. Schemat doświadczeń przeprowadzonych w celu oceny wpływu MIA i delecji genu *Lcn2* na ekspresję mRNA cytokin prozapalnych w łożysku i mózgu płodów, morfologię neuronów i ich właściwości elektrofizjologiczne oraz zachowanie potomstwa. Ciężarnym samicom o genotypie *Lcn2* Het podawano iniekcje soli fizjologicznej lub LPS, a potomstwo obu płci o genotypie *Lcn2* KO i WT wykorzystano do dalszych badań. **A** Aby zbadać rolę *Lcn2* w regulacji prenatalnej odpowiedzi zapalnej 4 godziny po ostatnim zastrzyku od ciężarnych samic pobrano łożyska, a także mózgi płodów, z których następnie wyizolowano przedmózgowie (z prawej półkuli) i hipokampy (z lewej półkuli) w celu izolacji RNA do oceny poziomu ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne w reakcji RT-qPCR. **B** Dorosłe potomstwo wykorzystano do badań elektrofizjologicznych, analizy gęstości i kształtu kolców dendrytycznych oraz badań behawioralnych.

4.3.1. Wpływ MIA i delecji genu *Lcn2* na ekspresję mRNA cytokin prozapalnych w łożysku oraz w mózgu potomstwa E18

Aby zbadać rolę *Lcn2* w regulacji prenatalnej odpowiedzi zapalnej mózgu w modelu MIA ciężarnym samicom o genotypie *Lcn2* Het podawano iniekcje soli fizjologicznej lub LPS, a 4 godziny po ostatnim zastrzyku pobrano od nich łożyska, a także mózgi płodów obu płci o genotypie WT i KO, z których następnie wyizolowano przodomózgowia (z prawej półkuli) i hipokampy (z lewej półkuli) (Ryc. 10A). Z tkanek tych wyizolowano RNA, a następnie przeprowadzono reakcję RT-qPCR, aby ocenić poziom ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne - *Il-1 β* , *TNF- α* i *Il-6*. Ze względu na brak rozkładu normalnego uzyskanych danych zastosowano transformację logarytmiczną $Y = \ln(Y)$. W analizie statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z uwzględnieniem czynnika procedury (ctrl – myszy, których matki w ciąży otrzymywały zastrzyki soli fizjologicznej; MIA - myszy, których matki w ciąży otrzymywały zastrzyki LPS) oraz genotypu (WT i KO) z testem *post hoc* Tukey'a.



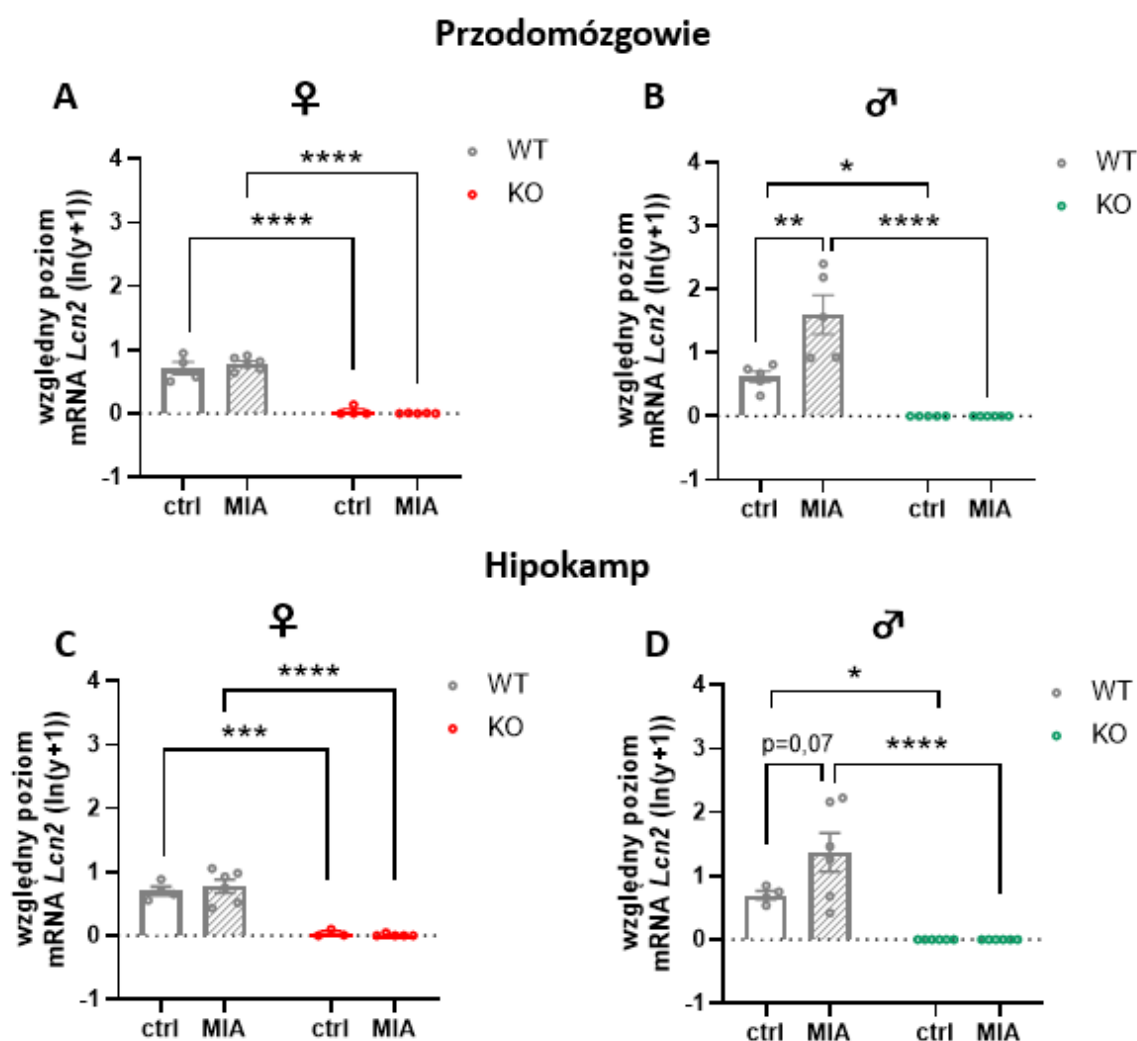
Ryc. 11. Wpływ MIA i/lub delekcji genu *Lcn2* na poziom ekspresji mRNA cytokin prozapalnych w łożysku, przodomózgowie i hipokampie płodów obu płci cztery godziny po ostatniej iniekcji soli fizjologicznej lub LPS. A, B, C, D, E, F Ekspresja mRNA genów kodujących cytokiny prozapalne w łożyskach pochodzących od czterech badanych grup samic (A - *Il-1β*, B - *TNF-α*, C - *Il-6*) i samców (D - *Il-1β*, E - *TNF-α*, F - *Il-6*). Liczebność grup łożysk od płodów samic: WT ctrl n=6, WT MIA n=6, KO ctrl n=5, KO MIA n=6; liczebność grup łożysk od płodów samców: WT ctrl n=5, WT MIA n=6, KO ctrl n=6, KO MIA n=5. G, H, I, J, K, L Ekspresja mRNA genów kodujących cytokiny prozapalne w przodomózgówkach pochodzących od czterech badanych grup samic (G - *Il-1β*, H - *TNF-α*, I - *Il-6*) i samców (J - *Il-1β*, K - *TNF-α*, L - *Il-6*). Liczebność grup samic: WT ctrl n=5, WT MIA n=6, KO ctrl n=4, KO MIA n=5; liczebność grup samców: WT ctrl n=5, WT MIA n=6, KO ctrl n=5, KO MIA n=6. M, N, O, P, R, S Ekspresja mRNA genów kodujących cytokiny prozapalne w hipokampach pochodzących od czterech badanych grup samic (M - *Il-1β*, N - *TNF-α*, O - *Il-6*) i samców (P - *Il-1β*, R - *TNF-α*, S - *Il-6*). Liczebność grup samic: WT ctrl n=3, WT MIA n=6, KO ctrl n=3, KO MIA n=5; liczebność grup samców: WT ctrl n=3, WT MIA n=6, KO ctrl n=6, KO MIA n=6. Na wszystkich wykresach dane zostały poddane przekształceniu logarytmicznemu $Y = \ln(Y)$. Uzyskane wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem *post hoc* Tukey'a, gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

W pierwszej kolejności oceniano wpływ aktywacji układu odpornościowego matki na poziom ekspresji mRNA cytokin prozapalnych w łożysku. Zarówno w przypadku łożysk pochodzących od płodów samic jak i samców dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotnie statycznie różnice w poziomie ekspresji mRNA *Il-1β*, *TNF-α* i *Il-6* między badanymi grupami, a czynnikiem różnicującym poziom ekspresji we wszystkich przypadkach była procedura (samice: *Il-1β* - $F(1, 18) = 49,10$, $p < 0,0001$; *TNF-α* - $F(1, 19) = 7,166$, $p = 0,0149$; *Il-6* - $F(1, 18) = 6,921$, $p = 0,0170$; samce: *Il-1β* - $F(1, 18) = 34,23$, $p < 0,0001$; *TNF-α* - $F(1, 18) = 13,42$, $p = 0,0018$; *Il-6* - $F(1, 17) = 5,558$, $p = 0,0306$). Dalsza analiza wykazała, że iniekcje LPS spowodowały znaczący wzrost ekspresji *Il-1β* w łożyskach pochodzących zarówno od płodów o genotypie dzikim, jak i płodów pozbawionych białka *Lcn2*, co było widoczne u potomstwa obu płci (samice WT ctr vs. WT MIA: $p = 0,0005$, KO ctrl vs. KO MIA: $p = 0,0006$, Ryc. 11A; samce WT ctr vs. WT MIA: $p = 0,0017$, KO ctrl vs. KO MIA: $p = 0,0059$, Ryc. 11D). Z kolei ekspresja *TNF-α* była zwiększona w odpowiedzi na MIA jedynie w łożysku pochodzącym od myszy dzikich obu płci (samice WT ctr vs. WT MIA: $p = 0,0243$, Ryc. 11B; samce WT ctr vs. WT MIA: $p = 0,0138$, Ryc. 11E). W przypadku *Il-6* odpowiedź łożyska na MIA była zależna od płci. U samic stwierdzono indukowany MIA wzrost ekspresji tego genu tylko u myszy z delecją genu *Lcn2* (KO ctr vs. KO MIA: $p = 0,0425$, Ryc. 11C). Co ciekawe, średnia ekspresja *Il-6* była wyższa u samic z grupy KO MIA w porównaniu do samic z grupy

WT MIA, jednak efekt ten nie osiągnął istotności statystycznej (WT MIA vs. KO MIA: $p=0,0907$). W łożyskach pochodzących od samców nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomie ekspresji mRNA *Il-6* między badanymi grupami (Ryc. 11F).

Aby ocenić wpływ delekcji *Lcn2* na regulację uogólnionej odpowiedzi zapalnej w mózgu zdecydowano się na charakterystykę profilu ekspresji mRNA cytokin prozapalnych w przodomózgowiu mózgu płodów E18, 4 godziny po ostatniej iniekcji ciężarnych matek. Dodatkowo lokalne zmiany ekspresji cytokin analizowano w hipokampie. Mimo, że odpowiedź zapalna w łożyskach była podobna u samców i samic to w przypadku mózgu zaobserwowano znaczące różnice w ekspresji mRNA cytokin prozapalnych u obu płci. U samic iniekcje LPS w okresie prenatalnym nie spowodowały statystycznie istotnych zmian w ekspresji żadnej z badanych cytokin prozapalnych ani w przodomózgowiu (Ryc. 11G, H, I), ani w hipokampie (Ryc. 11M, N, O). Tymczasem u samców stwierdzono różnice w poziomie ekspresji *Il-1 β* i *TNF- α* między badanymi grupami zwierząt. Czynnikiem różnicującym ekspresję badanych cytokin w przodomózgowiu był zarówno genotyp (*Il-1 β* - F (1, 17) = 4,721, $p=0,0442$; *TNF- α* - F (1, 18) = 6,975, $p=0,0166$) jak i procedura (*Il-1 β* - F (1, 17) = 16,16, $p=0,0009$; *TNF- α* - F (1, 18) = 5,936, $p=0,0255$), a w hipokampie poziom ekspresji *Il-1 β* i *TNF- α* różnicował jedynie czynnik procedury (*Il-1 β* - F (1, 17) = 12,92, $p=0,0022$; *TNF- α* - F (1, 19) = 6,880, $p=0,0167$). Podobnie jak w łożysku, ekspresja *Il-1 β* była zwiększona w odpowiedzi na MIA w przodomózgowiu (WT ctr vs. WT MIA: $p=0,0280$, Ryc. 11J), a także hipokampie samców dzikich (WT ctr vs. WT MIA: $p=0,0419$, Ryc. 11P). Indukowany LPS wzrost poziomu mRNA *Il-1 β* w obu badanych regionach mózgu był widoczny również u myszy z delecją genu *Lcn2*, jednak różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej (KO ctr vs. KO MIA: przodomózgowie – $p=0,0897$, Ryc. 11J; hipokamp – $p=0,1953$, Ryc. 11P). Z kolei ekspresja mRNA *TNF- α* wykazywała tendencję w kierunku wzrostu u samców z grupy WT MIA w porównaniu do samców kontrolnych zarówno w przodomózgowiu jak i hipokampie, jednak efekt ten nie osiągnął istotności statystycznej (WT ctrl vs. WT MIA: przodomózgowie - $p=0,0612$, Ryc. 11K; hipokamp – $p=0,1245$, Ryc. 11R). Co więcej, wzrost ekspresji *TNF- α* w przodomózgowiu po iniekcji LPS był istotnie wyższy u samców dzikich w porównaniu do samców z delecją genu *Lcn2* (WT MIA vs. KO MIA: $p=0,0347$, Ryc. 11K). Nie stwierdzono jednak zmian w poziomie ekspresji mRNA *Il-6* u samców w żadnym z badanych regionów mózgu (Ryc. 11L, S).

Oprócz badania poziomu mRNA cytokin prozapalnych sprawdzono również czy ekspresja *Lcn2* w przodomózgowiu i hipokampie samców i samic WT będzie podwyższona 4 godziny po ostatniej iniekcji LPS. Ze względu na brak rozkładu normalnego uzyskanych danych oraz obecność wartości zerowych zastosowano przekształcenie logarymiczne $Y = \ln(Y+1)$. W analizie statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji, która we wszystkich grupach wykazała istotność czynnika genotypu (przodomózgowie: samice - $F(1, 15) = 191,0$, $p < 0,0001$, samce - $F(1, 17) = 53,20$, $p < 0,0001$; hipokamp: samice - $F(1, 14) = 77,53$, $p = 0,0001$, samce - $F(1, 18) = 36,51$, $p < 0,0001$). Dodatkowo, w przypadku analizy poziomu ekspresji *Lcn2* w przodomózgowiu u samców zaobserwowano także istotność czynnika procedury ($F(1, 17) = 10,30$, $p = 0,0051$) oraz interakcji między czynnikami ($F(1, 17) = 10,29$, $p = 0,0052$). U samic i samców z delecją *Lcn2* nie stwierdzono ekspresji tego genu (test *post hoc* Tukey'a, przodomózgowie samice - WT ctrl vs. KO ctrl $p < 0,0001$, WT MIA vs. KO MIA $p < 0,0001$, Ryc. 12A; przodomózgowie samce - WT ctrl vs. KO ctrl $p = 0,0491$, WT MIA vs. KO MIA $p < 0,0001$, Ryc. 12B; hipokamp samice WT ctrl vs. KO ctrl $p = 0,0007$, WT MIA vs. KO MIA $p < 0,0001$, Ryc. 12C; hipokamp samce - WT ctrl vs. KO ctrl $p = 0,0498$, WT MIA vs. KO MIA $p < 0,0001$, Ryc. 12D). Podobnie jak w przypadku cytokin prozapalnych, u samic nie zaobserwowano zmian ekspresji mRNA *Lcn2* będących skutkiem podania LPS ani w przodomózgowiu (Ryc. 12A), ani hipokampie (Ryc. 12C). Z kolei u samców w obu regionach mózgu stwierdzono zwiększoną ekspresję mRNA *Lcn2* w odpowiedzi na MIA u myszy dzikich, jednak w hipokampie różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej (WT ctrl vs. WT MIA: przodomózgowie – $p = 0,0018$, Ryc. 12B; hipokamp – $p = 0,0740$, Ryc. 12D).



Ryc. 12. Wpływ MIA i/lub delekcji genu *Lcn2* na poziom ekspresji mRNA *Lcn2* w przedomózgowie i hipokampie płodów cztery godziny po ostatniej iniekcji soli fizjologicznej lub LPS. A, B Ekspresja mRNA *Lcn2* w przedomózgowie pochodzących od czterech badanych grup samic (A) i samców (B). **C, D** Ekspresja mRNA *Lcn2* w hipokampie pochodzących od czterech badanych grup samic (C) i samców (D). Na wszystkich wykresach dane zostały poddane przekształceniu $Y=\ln(Y+1)$. Uzyskane wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy. Liczebność grup samic: przedomózgowie - WT ctrl n=4, WT MIA n=6, KO ctrl n=4, KO MIA n=5; hipokamp - WT ctrl n=4, WT MIA n=6, KO ctrl n=3, KO MIA n=5; liczebność grup samców: przedomózgowie - WT ctrl n=5, WT MIA n=5, KO ctrl n=5, KO MIA n=6; hipokamp - WT ctrl n=4, WT MIA n=6, KO ctrl n=6, KO MIA n=6. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem *post hoc* Tukey'a, gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami: *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

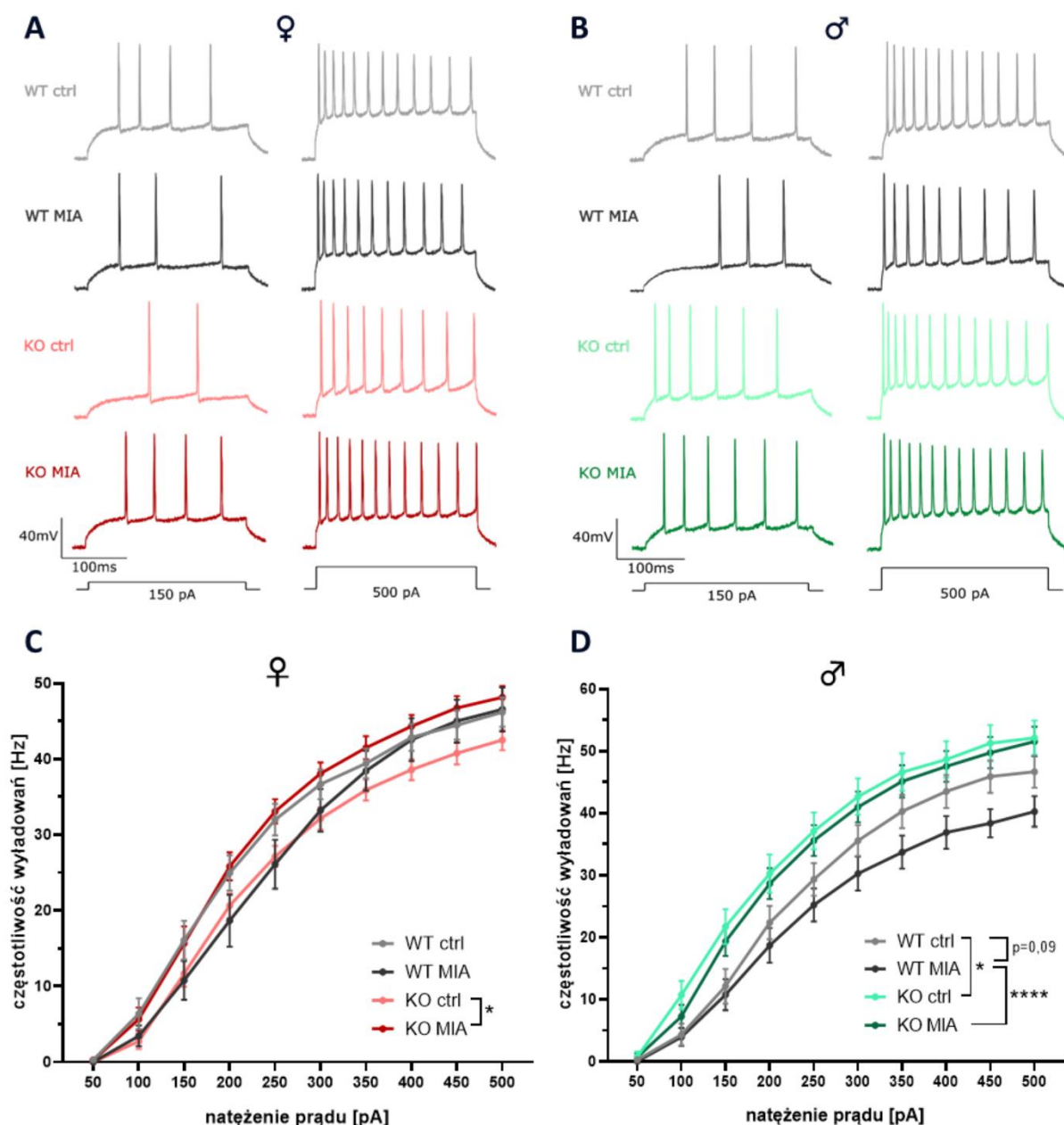
4.3.2. Wpływ MIA i delecji genu *Lcn2* na właściwości elektrofizjologiczne neuronów pola CA1 hipokampa

4.3.2.1. Analiza pobudliwości własnej neuronów

Pobudliwość własna komórek nerwowych wiąże się z ich zdolnością do wytwarzania potencjałów czynnościowych w odpowiedzi na napływające bodźce. Jest ona determinowana przez właściwości błony komórkowej, które wynikają z liczby i kompozycji kanałów jonowych. Zmiany pobudliwości własnej w wyniku aktywności sieci neuronalnej stanowią jeden z mechanizmów plastyczności neuronalnej.

Aby ocenić czy infekcja w ciąży oraz brak białka *Lcn2* wpływają na pobudliwość własną neuronów CA1 hipokampa przeprowadzono rejestracje elektrofizjologiczne na skrawkach mózgu myszy WT i KO obu płci pochodzących od matek poddanych MIA i kontrolnych. Przykłady wyładowań neuronów piramidowych hipokampa przedstawiono na rycinach 13A (samice) i 13B (samce), a krzywe zależności częstotliwości wyładowań od natężenia prądu dla 4 badanych grup myszy zaprezentowano na rycinach 13C (samice) i 13D (samce). W analizie statystycznej wykorzystano trójczynnikową analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami z uwzględnieniem czynnika genotypu (WT i KO), procedury (ctrl i MIA) oraz natężenia prądu (50 - 500pA), która u samic wykazała istotność czynnika natężenia prądu ($F(1,224, 67,33) = 1076, p < 0,0001$), jak również interakcji natężenia prądu i procedury ($F(9, 495) = 2,329, p = 0,0142$), interakcji procedury i genotypu ($F(1, 55) = 5,163, p = 0,0270$) oraz interakcji natężenia prądu, procedury i genotypu ($F(9, 495) = 2,774, p = 0,0035$). Test *post hoc* Tukey'a wykazał istotny statystycznie wzrost pobudliwości własnej w odpowiedzi na MIA jedynie u samic z delecją genu *Lcn2* (KO ctrl vs. KO MIA $p = 0,0499$, Ryc. 13C). U samców czynnikami różnicującym pobudliwość własną komórek piramidowych pola CA1 hipokampa były natężenie prądu ($F(9, 765) = 1039, p < 0,0001$), genotyp ($F(1, 85) = 11,05, p = 0,0013$), interakcja natężenia prądu i genotypu ($F(9, 765) = 6,685, p < 0,0001$), jak również interakcja natężenia prądu, procedury i genotypu ($F(9, 765) = 2,205, p = 0,0200$). Zaobserwowano spadek pobudliwości własnej spowodowany iniekcjami LPS w okresie prenatalnym u myszy dzikich, jednak efekt ten nie osiągnął istotności statystycznej (WT ctrl vs. WT MIA $p = 0,098$, Ryc. 13D). Z kolei samce z delecją genu *Lcn2* charakteryzowały się podwyższoną pobudliwością własną w porównaniu do

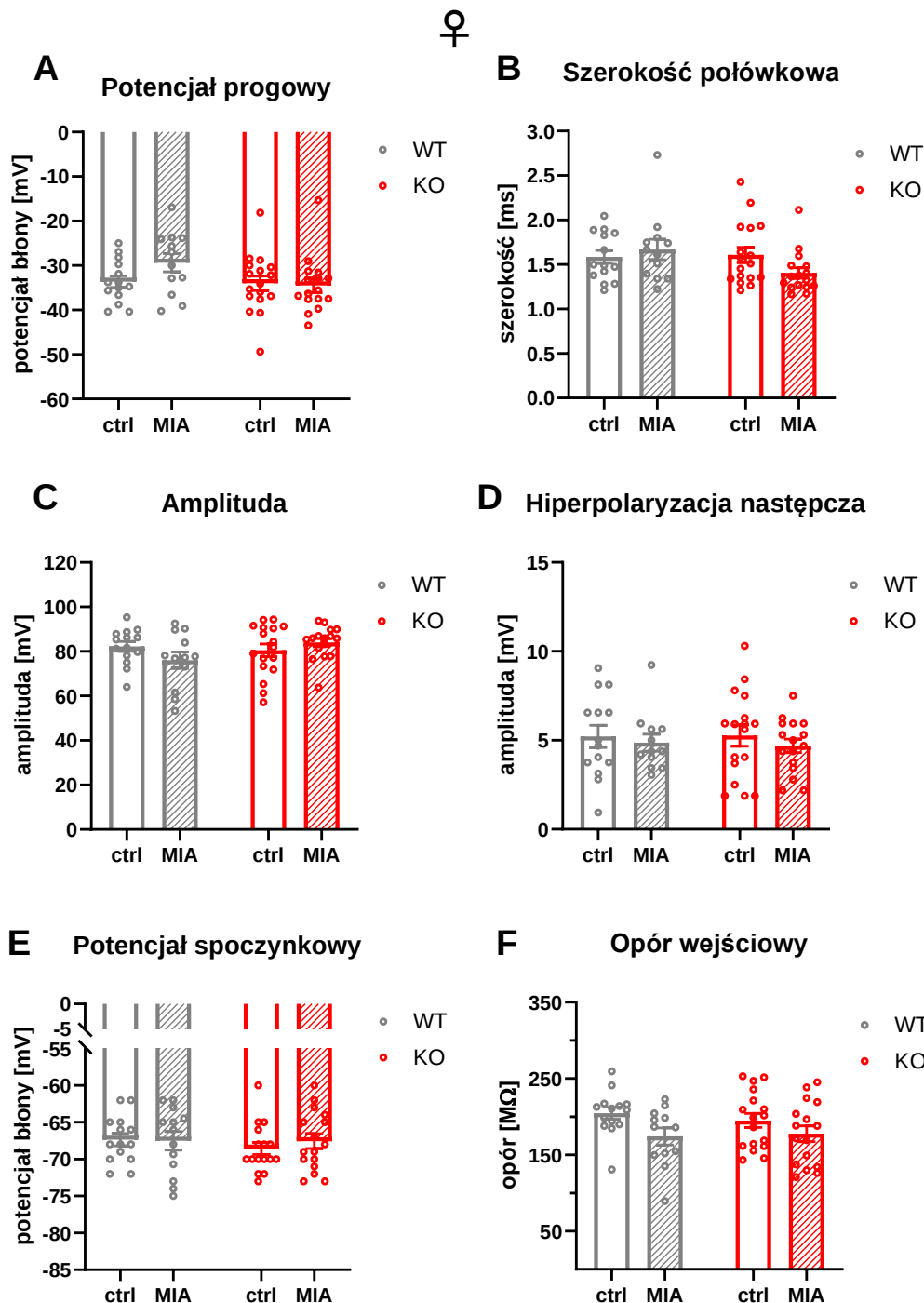
samców o prawidłowym genotypie zarówno w grupie kontrolnej (WT ctrl vs. KO ctrl $p=0,0144$) jak i po MIA (WT MIA vs. KO MIA $p<0,0001$, Ryc. 13D).



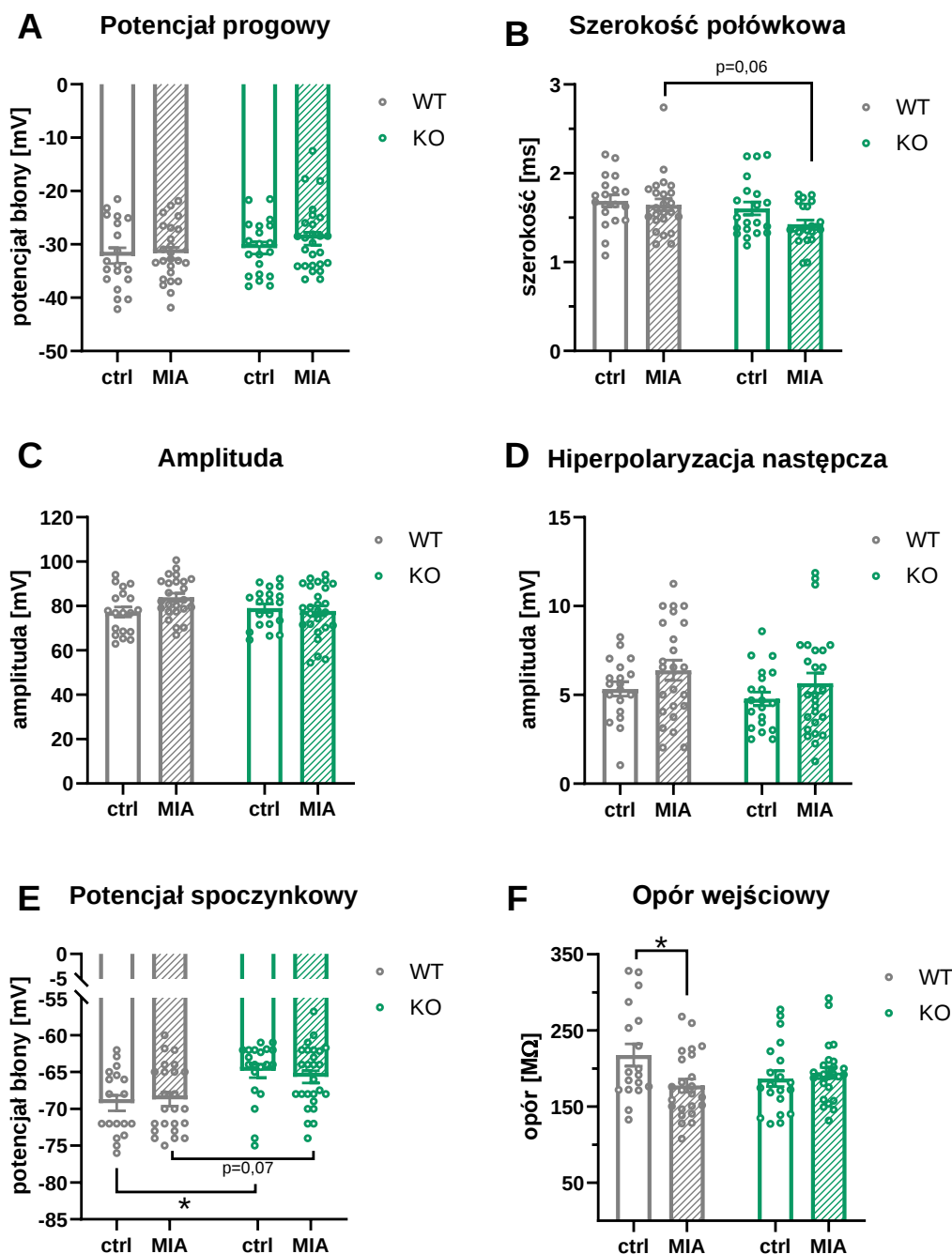
Ryc. 13. Wpływ MIA i/lub delecji genu *Lcn2* na pobudliwość własną neuronów piramidowych pola CA1 hipokampa. **A, B** Przykłady wyładowań neuronów piramidowych warstwy CA1 hipokampa wywołanych stymulacją prądem o natężeniu 150 pA i 500 pA dla czterech badanych grup samic (**A**) i samców (**B**). **C, D** Wykresy zależności częstotliwości wyładowań od natężenia prądu dla samic (**C**) i samców (**D**). Dane przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, samice WT ctrl $n=4$ (14), WT MIA $n=3$ (13), KO ctrl $n=4$ (16), KO MIA $n=5$ (16), samce WT ctrl $n=5$ (19), WT MIA $n=7$ (24), KO ctrl $n=6$ (20), KO MIA $n=7$ (26), gdzie n = liczba myszy (liczba komórek). Zastosowano trójczynnikową analizę wariancji z testem *post hoc* Tukey'a, gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami: * $p<0,05$, **** $p<0,0001$.

4.3.2.2. Analiza parametrów potencjałów czynnościowych oraz podstawowych parametrów elektrofizjologicznych

Różnice w pobudliwości komórek nerwowych mogą być związane ze zmianami parametrów potencjałów czynnościowych, takich jak m.in. potencjał progowy, amplituda czy szerokość połówkowa. Ponadto, także modyfikacje podstawowych parametrów fizjologicznych, takich jak potencjał spoczynkowy i opór wejściowy, mogą przekładać się na pobudliwość neuronów. Dlatego też przeprowadzono analizę tych parametrów dla wszystkich badanych grup zwierząt. Mierzono właściwości drugiego potencjału czynnościowego wywołanego przez pobudzenie prądem o natężeniu 450 pA. Uzyskane wyniki na rycinach 14 (samice) i 15 (samce). U samic dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotne statystycznie zmiany jedynie w przypadku oporu wejściowego, a czynnikiem różnicującym ten parametr była procedura ($F(1, 55) = 5,978, p=0,0177$). W teście *post hoc* Tukey'a nie odnotowano jednak istotnych różnic między badanymi grupami samic (Ryc. 14F). U samców spośród parametrów potencjałów czynnościowych znaczące różnice zaobserwowano w przypadku szerokości połówkowej - dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała, że czynnikiem różnicującym ten parametr był genotyp ($F(1, 81) = 5,638, p=0,0199$). Delecja genu *Lcn2* skutkowała zmniejszeniem szerokości połówkowej potencjałów czynnościowych u samców poddanych MIA, jednak efekt ten nie osiągnął istotności statystycznej (test *post hoc* Tukey'a, WT MIA vs. KO MIA: $p=0,0638$, Ryc. 15B). Samce różniły się także wartościami potencjału spoczynkowego, na które największy wpływ miał genotyp badanych myszy (dwuczynnikowa analiza wariancji $F(1, 84) = 15,82, p=0,0001$). Delecja genu *Lcn2* spowodowała zmianę wartości potencjału spoczynkowego w kierunku mniej ujemnym zarówno u samców kontrolnych (test *post hoc* Tukey'a, WT ctrl vs. KO ctrl: $p=0,0132$), jak i poddanych MIA, jednak w drugim przypadku różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej (WT ctrl vs. KO ctrl: $p=0,0703$, Ryc. 15E). Stwierdzono także istotne różnice w wartości oporu wejściowego między badanymi grupami samców, a czynnikiem różnicującym ten parametr była interakcja genotypu i procedury ($F(1, 84) = 5,642, p=0,0198$). Iniekcje LPS w okresie prenatalnym spowodowały spadek oporu wejściowego u samców dzikich (WT ctrl vs. WT MIA: $p=0,0405$, Ryc. 15F).



Ryc. 14. Parametry potencjałów czynnościowych (A-D) oraz podstawowe parametry elektrofizjologiczne (E-F) neuronów pola CA1 hipokampa dla czterech badanych grup *samic*. A Potencjał progowy. B Szerokość połówkowa potencjałów czynnościowych. C Amplituda potencjałów czynnościowych. D Hiperpolaryzacja następcza. E Potencjał spoczynkowy. F Opór wejściowy. Na wszystkich wykresach dane przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, WT ctrl $n=4$ (14), WT MIA $n=3$ (13), KO ctrl $n=4$ (16), KO MIA $n=5$ (16), gdzie n = liczba myszy (liczba komórek). Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem *post hoc* Tukey'a, gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami: * $p<0,05$.



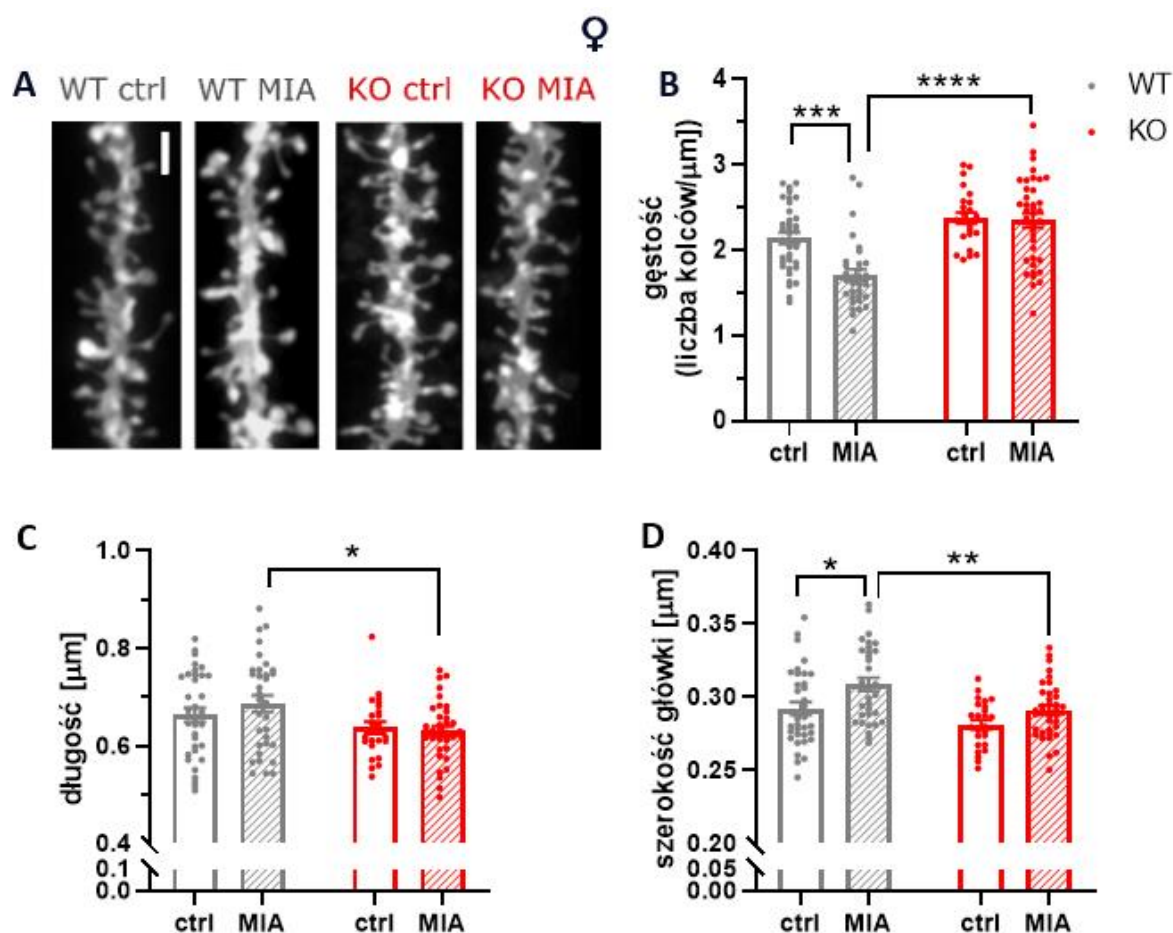
Ryc. 15. Parametry potencjałów czynnościowych (A-D) oraz podstawowe parametry elektrofizjologiczne (E-F) neuronów pola CA1 hipokampa dla czterech badanych grup samców. A Potencjał progowy. **B** Szerokość połówkowa potencjałów czynnościowych. **C** Amplituda potencjałów czynnościowych. **D** Hiperpolaryzacja następcza. **E** Potencjał spoczynkowy. **F** Opór wejściowy. Na wszystkich wykresach dane przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, WT ctrl n=5 (19), WT MIA n=7 (24), KO ctrl n=6 (20), KO MIA n=7 (26), gdzie n = liczba myszy (liczba komórek). Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem *post hoc* Tukey'a, gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami: *p<0,05.

4.3.3. Wpływ MIA i delecji genu *Lcn2* na gęstość i morfologię kolców dendrytycznych neuronów piramidowych pola CA1 hipokampa

Zmiany gęstości i morfologii kolców dendrytycznych w różnych strukturach mózgu są często obserwowanym fenotypem zarówno u pacjentów z zaburzeniami neurorozwojowymi, jak i w modelach zwierzęcych MIA. Aby ocenić czy zastosowanie modelu infekcji prenatalnej wraz z delecją genu *Lcn2* wpłynie na gęstość i morfologię kolców dendrytycznych w hipokampie przeprowadzono barwienia skrawków mózgu dorosłych myszy metodą biobalistyczną. W celu wyznakowania dendrytów zastosowano mikrocząsteczki wolframowe pokryte lipofilnym barwnikiem DiI, który wbudowuje się w błony komórkowe. Dendryty apikalne drugo- i trzeciorzędowe neuronów piramidowych pola CA1 hipokampa obrazowano następnie za pomocą mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM800 Airyscan, a uzyskane obrazy analizowano przy użyciu programu SpineMagick!. W doświadczeniu porównywano gęstość, długość, a także szerokość główki kolców dendrytycznych myszy obu płci z delecją genu *Lcn2* oraz kontrolnych, które w trakcie rozwoju prenatalnego zostały narażone na iniekcje soli fizjologicznej lub LPS.

U samic dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotne statystycznie różnice w gęstości kolców dendrytycznych, a czynnikami różnicującymi ten parametr były zarówno genotyp ($F(1, 128) = 35,60, p < 0,0001$), procedura ($F(1, 128) = 9,785, p = 0,0022$), jak i interakcja obu czynników ($F(1, 128) = 7,554, p = 0,0069$). Iniekcje LPS w rozwoju prenatalnym skutkowały istotnym statystycznie spadkiem gęstości kolców dendrytycznych neuronów hipokampa u samic WT (test *post hoc* Tukey'a, WT ctrl vs. WT MIA: $p = 0,0002$, Ryc. 16B). Co ciekawe, takiego efektu nie zaobserwowano u myszy KO. Kolce myszy z delecją genu *Lcn2* poddanych procedurze MIA były istotnie statystycznie dłuższe niż u myszy WT MIA (test *post hoc* Tukey'a, WT MIA vs. KO MIA: $p < 0,0001$, Ryc. 16B). Badane grupy zwierząt różniły się także kształtem wypustek dendrytycznych – zarówno długością (dwuczynnikowa analiza wariancji, czynnik genotypu ($F(1, 128) = 8,923, p = 0,0034$), jak i szerokością główki (dwuczynnikowa analiza wariancji, czynnik procedury ($F(1, 128) = 11,21, p = 0,0011$, czynnik genotypu ($F(1, 128) = 13,05, p = 0,0004$). MIA nie wpłynęła na długość kolców dendrytycznych samic WT, ale spowodowała niewielki wzrost szerokości główki (test *post hoc* Tukey'a, WT ctrl vs. WT MIA: $p = 0,0141$, Ryc. 16D). Nie zaobserwowano jednak wpływu MIA na kształt kolców dendrytycznych

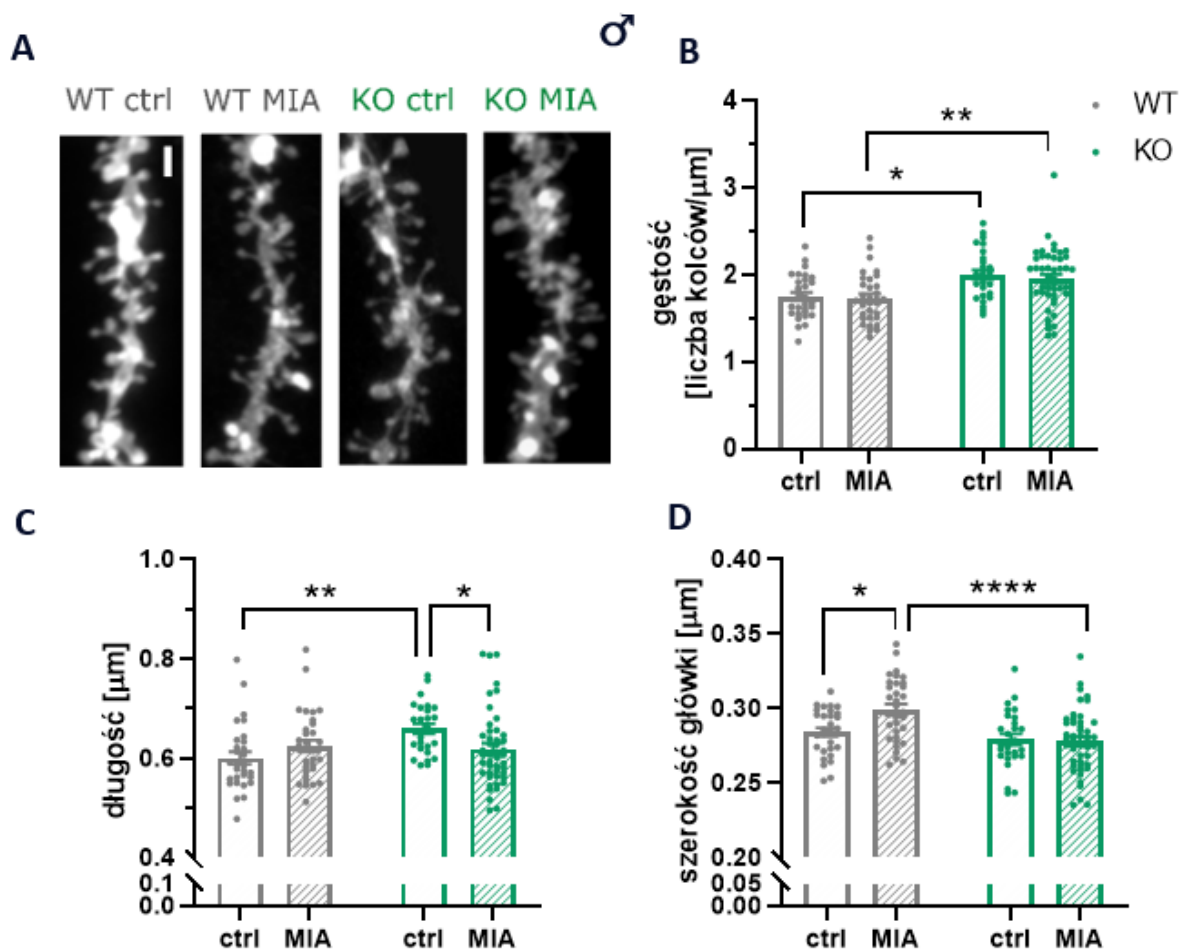
u myszy KO. Dodatkowo, kolce dendrytyczne samic z grupy KO MIA były istotnie statystycznie krótsze, w porównaniu do grupy WT MIA (test *post hoc* Tukey'a, WT MIA vs. KO MIA: $p=0,0160$, Ryc. 16C), oraz miały węższe główki (test *post hoc* Tukey'a, WT MIA vs. KO MIA: $p=0,0068$, Ryc. 16D).



Ryc. 16. Wpływ MIA i/lub delecji genu *Lcn2* na gęstość i morfologię kolców dendrytycznych dendrytów apikalnych neuronów piramidowych pola CA1 hipokampa u samic. **A** Przykładowe zdjęcia przedstawiające kolce dendrytyczne czterech badanych grup myszy. Skala 1 μm . **B** Gęstość kolców dendrytycznych przedstawiona jako liczba kolców/ μm . **C** Długość kolców dendrytycznych. **D** Szerokość główki kolców dendrytycznych. Dane przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, WT ctrl $n=6$ (36), WT MIA $n=7$ (33), KO ctrl $n=4$ (25), KO MIA $n=6$ (38), gdzie n = liczba myszy (liczba komórek). Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem *post hoc* Tukey'a, gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

W przypadku samców dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotne statystycznie różnice w gęstości kolców dendrytycznych neuronów pola CA1 hipokampa, jednak w przeciwieństwie do samic czynnikiem różnicującym ten parametr był jedynie genotyp ($F(1, 132) = 20,40$, $p<0,0001$). W teście *post hoc* Tukey'a stwierdzono, że brak białka *Lcn2*

skutkuje istotnym statystycznie wzrostem gęstości kolców dendrytycznych zarówno u samców kontrolnych (WT ctrl vs. KO ctrl: $p=0,0102$; Ryc. 17B) jak i poddanych procedurze MIA (WT MIA vs. KO MIA: $p=0,0080$, Ryc. 17B), jednak zmiany te były stosunkowo niewielkie (WT ctrl $1,75 \pm 0,05$ vs. KO ctrl $2,00 \pm 0,05$; WT MIA $1,73 \pm 0,04$ vs. KO MIA $1,954 \pm 0,05$). Wykazano także różnice w morfologii kolców dendrytycznych u badanych grup zwierząt w postaci zmiany długości (dwuczynnikowa analiza wariancji, genotyp $F(1, 132) = 5,330$, $p=0,0225$; interakcja $F(1, 132) = 8,525$, $p=0,0041$) oraz szerokości główki kolców dendrytycznych (dwuczynnikowa analiza wariancji; genotyp $F(1, 132) = 14,15$, $p=0,0003$; procedura $F(1, 132) = 4,001$, $p=0,0475$; interakcja $F(1, 132) = 5,419$, $p=0,0214$). Wpływ iniekcji LPS w okresie prenatalnym na kształt wypustek dendrytycznych był analogiczny jak u samic – kolce samców z grupy WT MIA nie różniły się długością, ale charakteryzowały się szerszą główką w porównaniu do grupy kontrolnej (test *post hoc* Tukey’a WT ctrl vs. WT MIA: $p=0,0168$, Ryc. 17D). Delecja genu *Lcn2* u samców poddanych MIA spowodowała zmniejszenie szerokości główki (test *post hoc* Tukey’a, WT MIA vs. KO MIA: $p<0,0001$, Ryc. 17D), podobnie jak w przypadku samic. Z kolei kolce dendrytyczne samców KO z grupy kontrolnej były dłuższe zarówno od kolców myszy dzikich (test *post hoc* Tukey’a WT ctrl vs. KO ctrl: $p=0,0042$, Ryc. 17C) jak i samców z grupy KO MIA (KO ctrl vs. KO MIA: $p=0,0456$, Ryc. 17C).



Ryc. 17. Wpływ MIA i/lub delecji genu *Lcn2* na gęstość i morfologię kolców dendrytycznych dendrytów apikalnych neuronów piramidowych pola CA1 hipokampa u samców. **A** Przykładowe zdjęcia przedstawiające kolce dendrytyczne czterech badanych grup myszy. Skala 1 μm. **B** Gęstość kolców dendrytycznych przedstawiona jako liczba kolców/μm. **C** Długość kolców dendrytycznych. **D** Szerokość główki kolców dendrytycznych. Dane przedstawiono jako wartość średnią ± błąd standardowy, WT ctrl n=5 (30), WT MIA n=6 (33), KO ctrl n=4 (27), KO MIA n=7 (46), gdzie n = liczba myszy (liczba komórek). Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem *post hoc* Tukey'a, gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami: *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001.

4.3.4. Wpływ MIA i delecji genu *Lcn2* na zachowanie zwierząt

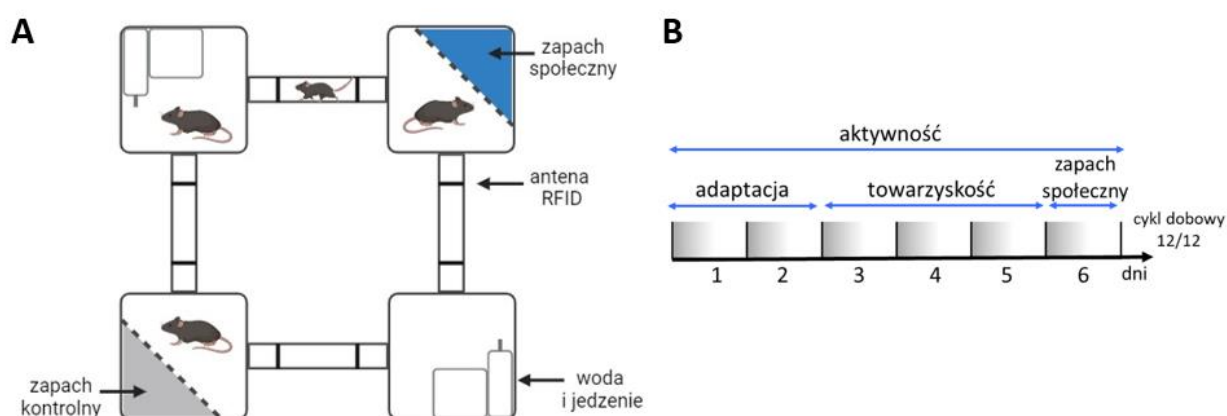
Zaburzenia neurorozwojowe charakteryzują się dysfunkcjami behawioralnymi takimi jak zaburzenia zachowań społecznych, zachowania powtarzalne, zaburzenia lękowe czy zaburzenia funkcji poznawczych. Podobne deficyty obserwuje się w modelach zwierzęcych zaburzeń neurorozwojowych. W celu oceny wpływu braku białka *Lcn2* oraz infekcji prenatalnej na zachowanie zwierząt dorosłych przeprowadzono serię testów behawioralnych obejmujących badanie zachowań społecznych w klatkach Eco-HAB oraz

teście trójkomorowym, test zakopywania kulek, test podwyższonego labiryntu krzyżowego oraz trening apetytywny w klatkach IntelliCage.

4.3.4.1. Zachowania społeczne

4.3.4.1.1. Ocena zachowań społecznych myszy w klatkach Eco-HAB

Aby zweryfikować czy iniekcje LPS w ciąży oraz brak białka Lcn2 wpływają na zachowania społeczne zwierząt przeprowadzono test z użyciem zautomatyzowanego systemu Eco-HAB (Ryc. 18A), który umożliwia badanie zwierząt w grupie (Puścian i in., 2016). Eksperyment trwał sześć dni, podczas których oceniano ogólną aktywność zwierząt, a także ich towarzyskość, czyli skłonność myszy do przebywania z innymi osobnikami (Ryc. 18B). Ostatniego dnia eksperymentu w jednej z komór umieszczono węchowy bodziec społeczny, będący ściółką pochodzącą od nieznanych myszy, a w drugiej bodziec kontrolny, będący czystą ściółką i oceniano zainteresowanie myszy społecznym bodźcem zapachowym. Biorąc pod uwagę, że myszy są aktywne głównie w nocy, do analizy zachowań społecznych wykorzystano dane pochodzące z faz ciemnych eksperymentu. Doświadczenie przeprowadzono na dorosłych (8-11 tygodni) samcach i samicach o genotypie WT i KO, których matki otrzymywały w ciąży zastrzyki soli fizjologicznej lub LPS.

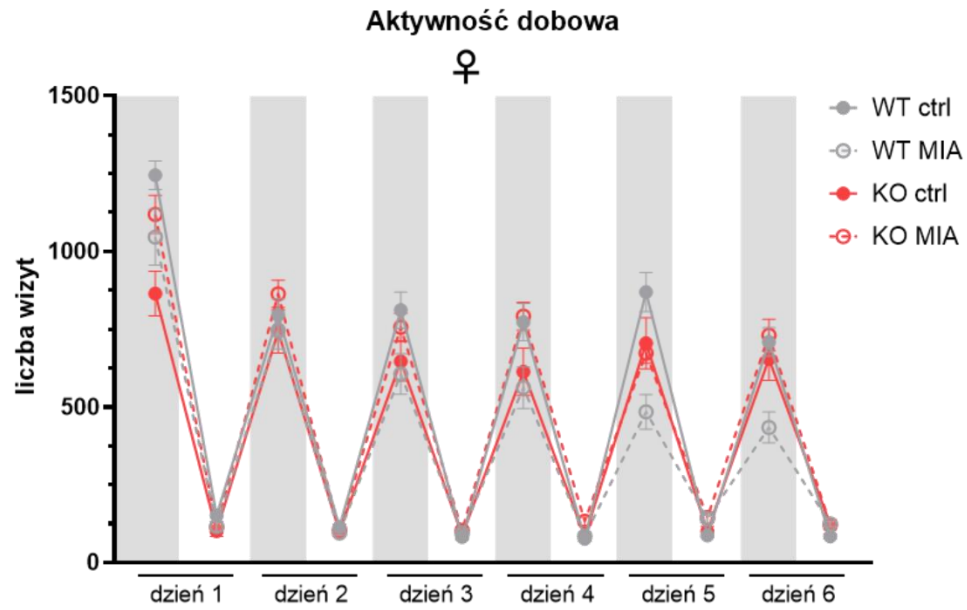
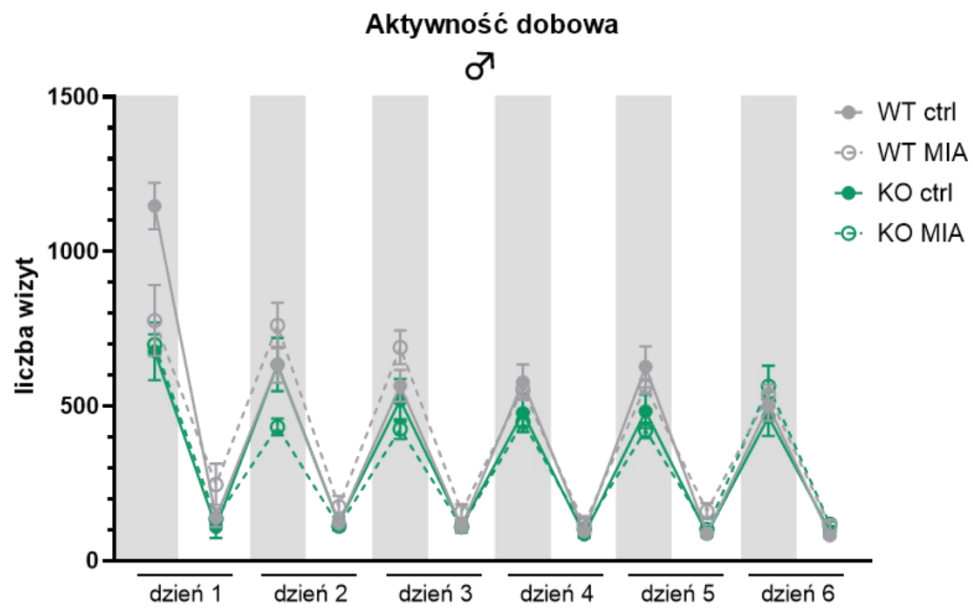


Ryc. 18. Schemat eksperymentu w klatce Eco-HAB. A Budowa klatki Echo-HAB. B Przebieg eksperymentu w klatce Eco-HAB.

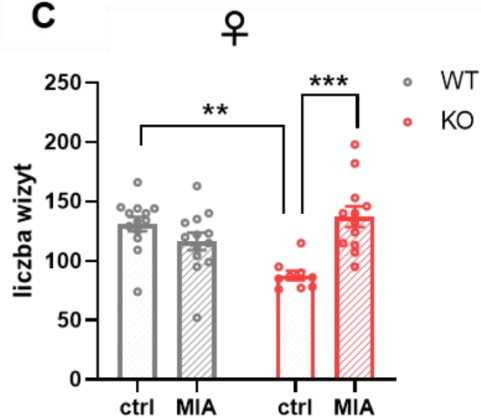
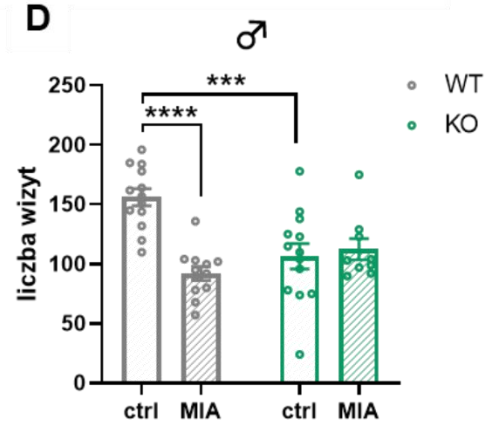
Pierwszym badanym parametrem była aktywność myszy, którą wyrażono jako liczbę wizyt we wszystkich przedziałach systemu Eco-HAB. W pierwszej kolejności oceniano rytm okołodobowy i zaobserwowano typowy dla myszy wzór aktywności, to jest większą

aktywność w fazie ciemnej i zmniejszoną aktywność w fazie jasnej, u wszystkich badanych grup zwierząt obu płci (Ryc. 19A, B). Następnie oceniano aktywność zwierząt w nowym środowisku, to jest w pierwszej godzinie po umieszczeniu w klatkach Eco-HAB. W analizie statystycznej zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji, która u samic wykazała istotny wpływ czynnika procedury ($F(1, 43) = 5,831, p=0,0201$) oraz interakcji genotypu i procedury ($F(1, 43) = 19,88, p<0,0001$) na aktywność w pierwszej godzinie eksperymentu. Test *post hoc* Tukey'a wykazał istotny statystycznie spadek aktywności w pierwszej godzinie eksperymentu u samic kontrolnych z delecją genu *Lcn2* w porównaniu do samic kontrolnych WT (WT ctrl vs. KO ctrl: $p=0,001$), a także w porównaniu do samic z grupy KO MIA (KO ctrl vs. KO MIA: $p=0,0002$; Ryc. 19C). Wyniki te sugerują, że największy wpływ na aktywność w nowym środowisku u samic ma delecja genu *Lcn2* u myszy kontrolnych.

W przypadku samców wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji dla aktywności w pierwszej godzinie były analogiczne jak u samic – wykazano istotność czynnika procedury ($F(1, 43) = 11,41, p=0,0016$) oraz interakcji genotypu i procedury ($F(1, 43) = 16,61, p=0,0002$). Zaobserwowano, że delecja genu *Lcn2* w grupie kontrolnej oraz procedura MIA u myszy dzikich powodują obniżenie aktywności myszy w pierwszej godzinie eksperymentu (test *post hoc* Tukey'a, WT ctrl vs. KO ctrl: $p=0,0005$, WT ctrl vs. WT MIA: $p<0,0001$, Ryc. 19D). Uzyskane wyniki sugerują, że w przypadku samców na spadek aktywność w nowym środowisku może wpływać zarówno brak ekspresji *Lcn2* jak i aktywacja układu odpornościowego matki w życiu prenatalnym.

A**B**

Aktywność w nowym środowisku – pierwsza godzina

C**D**

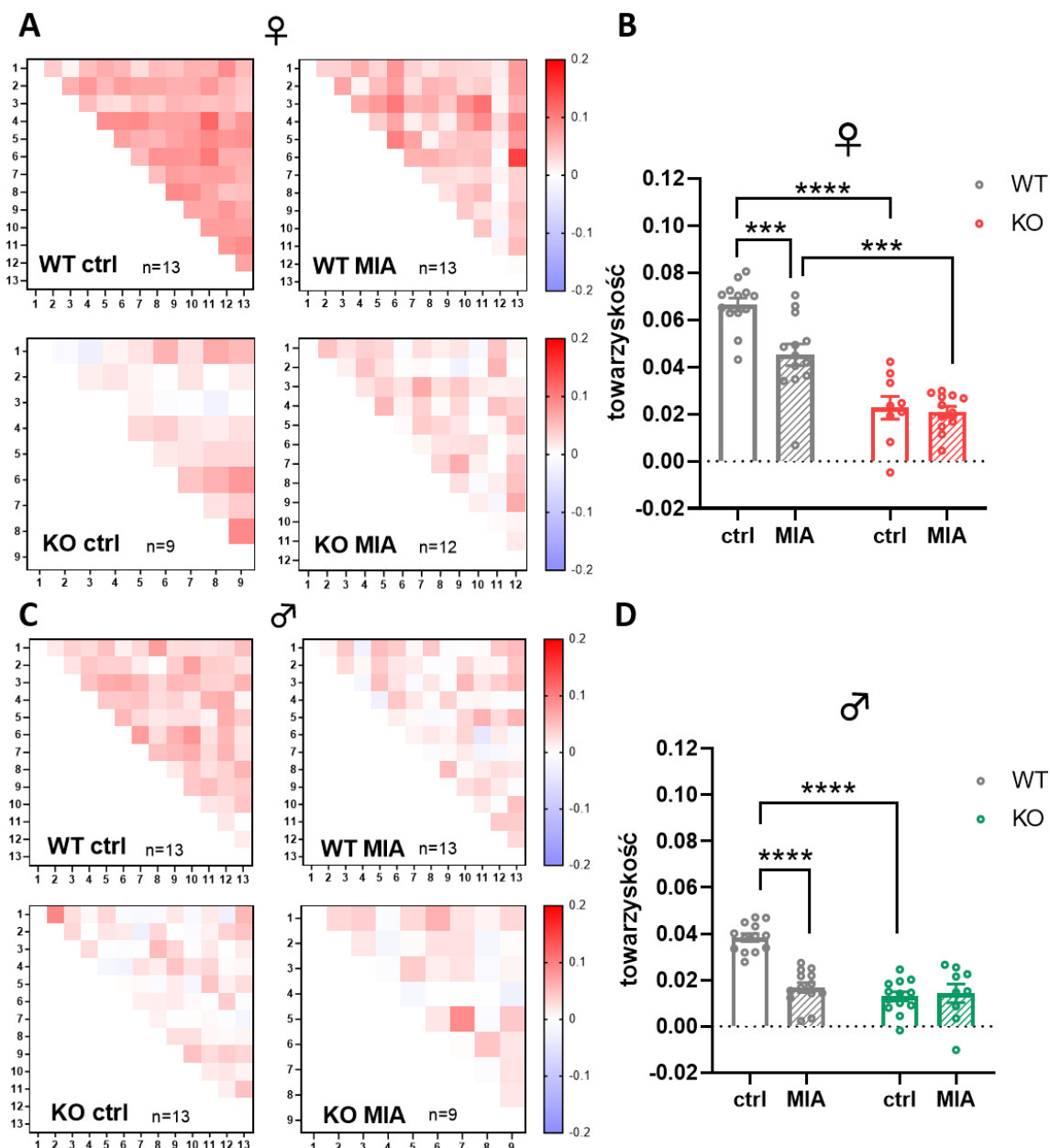
Ryc. 19. Wpływ MIA i/lub delecji genu *Lcn2* na aktywność myszy w systemie Eco-HAB w zależności od płci. Na wykresach przedstawiono aktywność myszy jako liczbę wszystkich wizyt we wszystkich komorach systemu Eco-HAB w wybranych przedziałach czasowych. **A** Aktywność dobową myszy w kolejnych dniach doświadczenia. Na szaro zaznaczono fazy ciemne, na białą fazy jasne. **B** Aktywność myszy w nowym środowisku – w pierwszej godzinie eksperymentu. Dane przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, samice WT ctrl n=13, WT MIA n=13, KO ctrl n=9, KO MIA n=12; samce WT ctrl n=13, WT MIA n=12, KO ctrl n=13, KO MIA n=9. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem *post hoc* Tukey’a, gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami: **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Kolejnym badanym parametrem była skłonność myszy do przebywania razem z innymi osobnikami, czyli towarzyskość. Parametr ten przedstawiono ilościowo jako czas spędzony razem dla danej pary myszy powyżej czasu, który byłby oczekiwany przez losową eksplorację lub przypadek. Dane przedstawiono w formie macierzy na rycinach 20 A i C. Każdy mały kwadrat w macierzy reprezentuje jedną parę myszy z grupy. Intensywność kolorów odzwierciedla wartość liczbową znormalizowanego parametru towarzyskości, która może przyjmować wartości dodatnie i ujemne. Wartości dodatnie reprezentują pozytywne zachowania społeczne netto (myszy spędzają czas razem). Wartości ujemne wskazują na względne unikanie się między daną parą. Wartości indywidualne towarzyskości dla poszczególnych myszy obliczono jako średnią ze wszystkich oddziaływań danej myszy i przedstawiono na wykresach słupkowych na rycinach 20 B i D.

W analizie statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji z uwzględnieniem czynnika procedury (ctrl i MIA) i genotypu (WT i KO), która u samic wykazała istotność czynnika procedury ($F(1, 43) = 9,429$; $p=0,0037$), jak również genotypu ($F(1, 43) = 82,52$; $p<0,0001$), a także interakcji między nimi ($F(1, 43) = 6,795$; $p=0,0125$). Test *post hoc* Tukey’a wykazał natomiast, że iniekcje LPS podczas ciąży spowodowały istotne statystycznie zmniejszenie skłonności myszy do przebywania z innymi osobnikami u zwierząt dzikich (WT ctrl vs. WT MIA: $p=0,0006$), ale nie u myszy pozbawionych białka *Lcn2* (Ryc. 20B). Co ciekawe, sama delecja genu *Lcn2* spowodowała spadek towarzyskości, co było charakterystyczne zarówno dla myszy kontrolnych (WT ctrl vs. KO ctrl: $p<0,0001$), jak i po infekcji prenatalnej (WT MIA vs. KO MIA: $p=0,0001$).

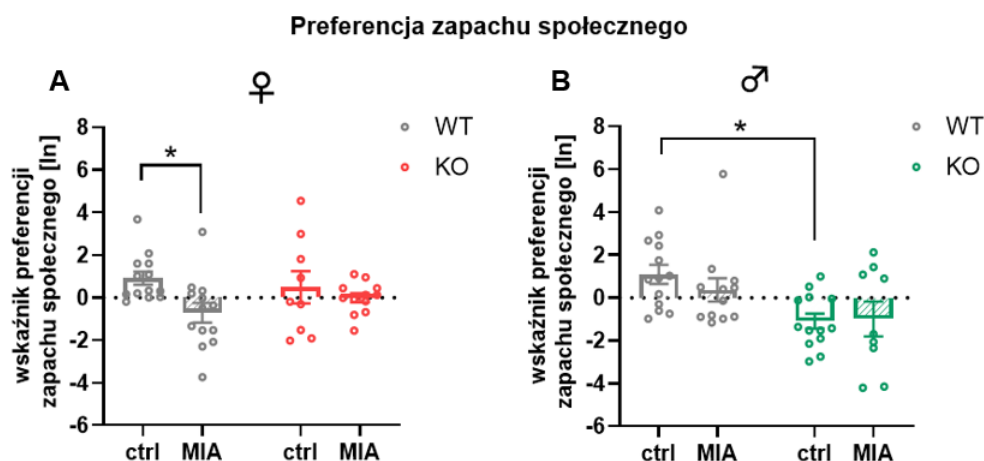
Podobne wyniki zaobserwowano u samców - dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotność czynnika procedury ($F(1, 44) = 18,05$, $p=0,0001$), genotypu ($F(1, 44) = 34,34$; $p<0,0001$), a także interakcji między nimi ($F(1, 44) = 23,09$; $p<0,0001$). Również test *post*

hoc Tukey'a wykazał, analogicznie jak u samic, obniżenie tendencji myszy WT do spędzania czasu z innymi osobnikami wywołane procedurą MIA (WT ctrl vs. WT MIA: $p < 0,0001$), ale nie u myszy KO (Ryc. 20D). Z kolei delecja genu *Lcn2* skutkowała zmniejszeniem wartości parametru towarzyskości tylko u myszy kontrolnych (WT ctrl vs. KO ctrl: $p < 0,0001$).



Ryc. 20. Wpływ MIA i/lub delecji genu *Lcn2* na skłonność myszy do dobrowolnego spędzania czasu z innymi myszami w zależności od płci. A, C Macierze przedstawiające towarzyskość w grupie samic (A) i samców (C) czyli skłonność myszy do dobrowolnego spędzania czasu z innymi myszami. **B, D** Towarzyskość samic (B) i samców (D) przedstawiona jako średnia wartość dla danej myszy w grupie. Dane przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, samice WT ctrl $n=13$, WT MIA $n=13$, KO ctrl $n=9$, KO MIA $n=12$; samce WT ctrl $n=13$, WT MIA $n=13$, KO ctrl $n=13$, KO MIA $n=9$. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem *post hoc* Tukey'a, gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami: *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Ostatnim badanym parametrem zachowania zwierząt w klatkach Eco-HAB była preferencja zapachu społecznego (Ryc. 21). Wskaźnik preferencji zapachu społecznego obliczono jako proporcję czasu spędzonego w komorze zawierającej społeczny bodziec węchowy do czasu spędzonego w komorze zawierającej kontrolny bodziec węchowy w ciągu pierwszych 30 minut po prezentacji bodźca, podzieloną przez analogiczną proporcję czasu z poprzedniej fazy ciemnej. Ze względu na brak rozkładu normalnego uzyskanych danych zastosowano transformację logarytmiczną $Y=\ln(Y)$. Wykorzystując dwuczynnikową analizę wariancji wykazano, że u samic na preferencję zapachu społecznego wpływa jedynie czynnik procedury ($F(1, 43) = 5,782$; $p=0,0206$). Wyniki analizy *post hoc* testem Tukey'a wskazują na obniżenie wskaźnika preferencji społecznej spowodowane infekcją prenatalną jedynie u samic dzikich (WT ctrl vs. WT MIA: $p=0.0387$, Ryc. 21A). Z kolei w przypadku samców czynnikiem wpływającym na preferencję zapachu społecznego jest wyłącznie genotyp ($F(1, 43) = 11,43$; $p=0,0015$). Obniżenie zainteresowania zapachem społecznym zaobserwowano tylko u samców z delecją genu *Lcn2* w porównaniu do myszy WT kontrolnych (test *post hoc* Tukey'a, WT ctrl vs. KO ctrl: $p=0,0157$, Ryc. 21B).



Ryc. 21. Wpływ MIA i/lub delecji genu *Lcn2* na zainteresowanie społecznym bodźcem zapachowym w zależności od płci. A, B Wskaźnik preferencji zapachu społecznego samic (A) i samców (B) obliczony jako proporcja czasu spędzonego w komorze zawierającej społeczny bodziec węchowy do czasu spędzonego w komorze zawierającej kontrolny bodziec węchowy w ciągu pierwszych 30 minut po prezentacji bodźca podzielona przez analogiczną proporcję z poprzedniej fazy ciemnej. Dane zostały poddane przekształceniu logarytmicznemu $Y=\ln(Y)$. Uzyskane wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, samice WT ctrl $n=13$, WT MIA $n=13$, KO ctrl $n=9$, KO MIA $n=12$; samce WT ctrl $n=13$, WT MIA $n=12$, KO ctrl $n=13$, KO MIA $n=9$. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem *post hoc* Tukey'a, gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami: $*p<0,05$.

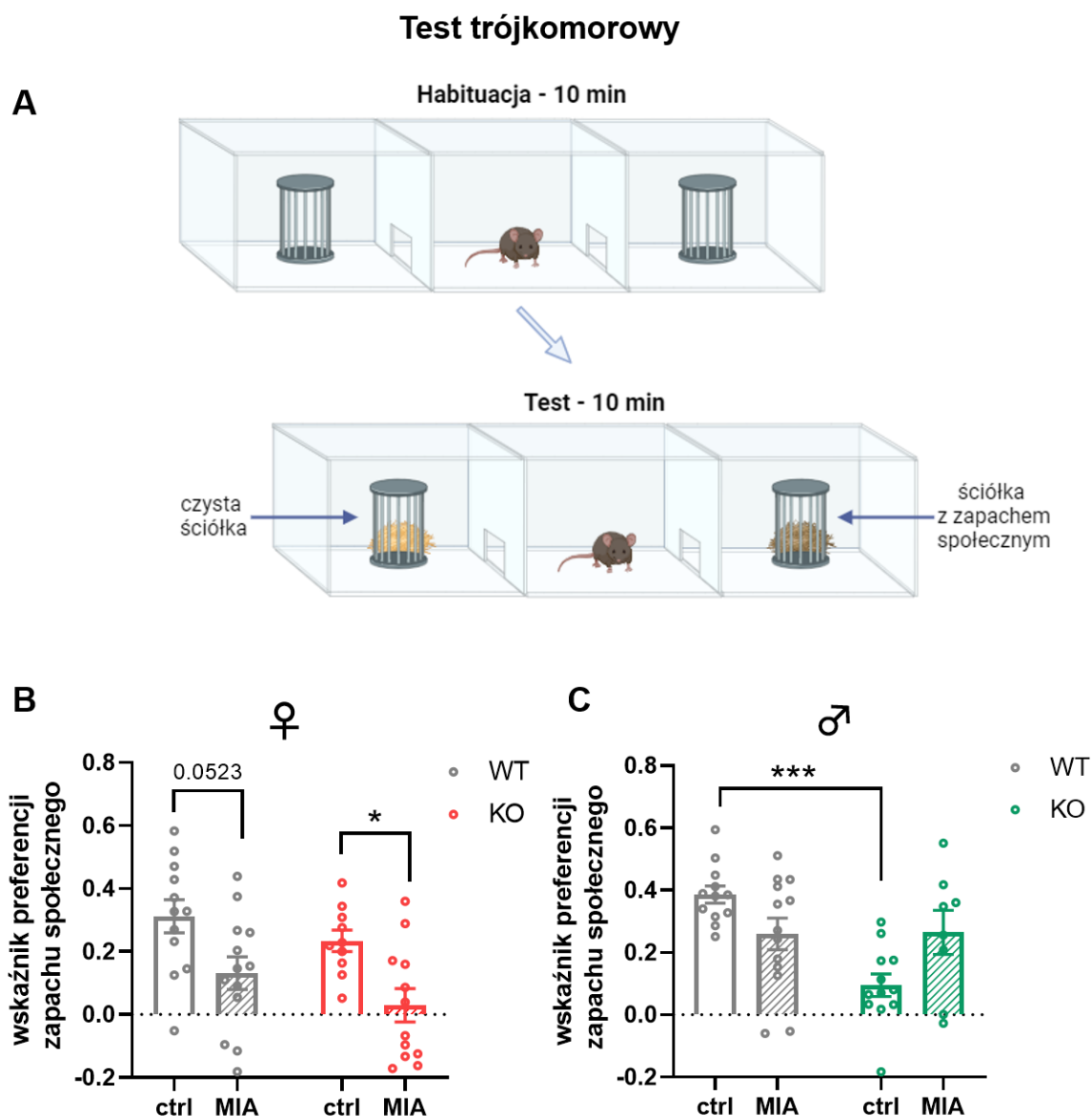
4.3.4.1.2. Ocena zachowań społecznych myszy w teście trójkomorowym

Aby potwierdzić wyniki uzyskane w systemie Eco-HAB zastosowano test trójkomorowy - klasyczną metodę, powszechnie używaną do badania zaburzeń w zachowaniu społecznym myszy. Test ten przeprowadza się w klatce podzielonej na 3 części; w dwóch skrajnych częściach znajdują się metalowe koszyczki, w których prezentuje się bodziec społeczny lub kontrolny (Ryc. 22A). W standardowej odmianie testu trójkomorowego bodźcem społecznym jest nieznana mysz, a bodźcem kontrolnym przedmiot nieożywiony (np. drewniany bloczek). W celu zwiększenia podobieństwa bodźców społecznych zastosowanych w obu testach (Eco-HAB i teście trójkomorowym) i ułatwienia interpretacji wyników jako bodziec kontrolny użyto czystej ściółki, a jako bodziec społeczny ściółki pochodzącej od nieznanych myszy. Test składał się z dwóch faz: fazy habituacji, podczas, której mysz eksplorowała komory klatki bez obecności bodźców zapachowych, oraz fazy testowej, w której w jednej komorze umieszczono ściółkę pochodzącą od nieznanych myszy, a w drugiej czystą ściółkę (Ryc. 22A). W teście oceniano czas interakcji myszy z koszyczkami, polegającej na węszeniu, dotykaniu koszyczka pyszczkiem lub wspinaniu się. Następnie obliczono wskaźnik preferencji zapachu społecznego według wzoru $IS = (TS - TNS) / (TS + TNS)$, gdzie IS – wskaźnik preferencji zapachu społecznego, TS – czas spędzony na oddziaływaniu z koszyczkiem z bodźcem społecznym, TN - czas spędzony na oddziaływaniu z koszyczkiem z bodźcem kontrolnym. W analizie statystycznej porównywano średnie wartości IS dla myszy WT i KO, których matki otrzymywały w ciąży iniekcje LPS lub soli fizjologicznej.

Dwuczynnikowa analiza wariancji potwierdziła wyniki uzyskane w teście Eco-HAB. W przypadku samic czynnikiem różnicującym wskaźnik preferencji zapachu społecznego była procedura ($F(1, 43) = 14,88$; $p=0,0004$), natomiast wykazano brak wpływu czynnika genotypu i interakcji między czynnikami. Test *post hoc* Tukey'a wykazał z kolei spadek zainteresowania społecznym bodźcem zapachowym wywołanego iniekcjami LPS w okresie prenatalnym u myszy dzikich, zmiana ta była na granicy progu istotności statystycznej (WT ctrl vs. WT MIA: $p=0,0523$, Ryc. 22B). Podobny efekt MIA zaobserwowano u myszy o genotypie KO (KO ctrl vs. KO MIA: $p=0,0368$, Ryc. 22B).

W przypadku samców, potwierdzono wpływ czynnika genotypu (dwuczynnikowa analiza wariancji; $F(1, 41) = 9,547$; $p=0,0036$) i brak wpływu czynnika procedury; przy obecności

istotności interakcji między czynnikami ($F(1, 41) = 10,18$; $p=0,0027$). Z kolei w teście *post hoc* Tukey'a uzyskano wyniki analogiczne do wyników otrzymanych w teście w klatce Eco-HAB - wskaźnik preferencji zapachu społecznego był zredukowany jedynie u samców z delecją genu *Lcn2* z grupy kontrolnej (WT ctrl vs. KO ctrl: $p=0,0002$, Ryc. 22C).



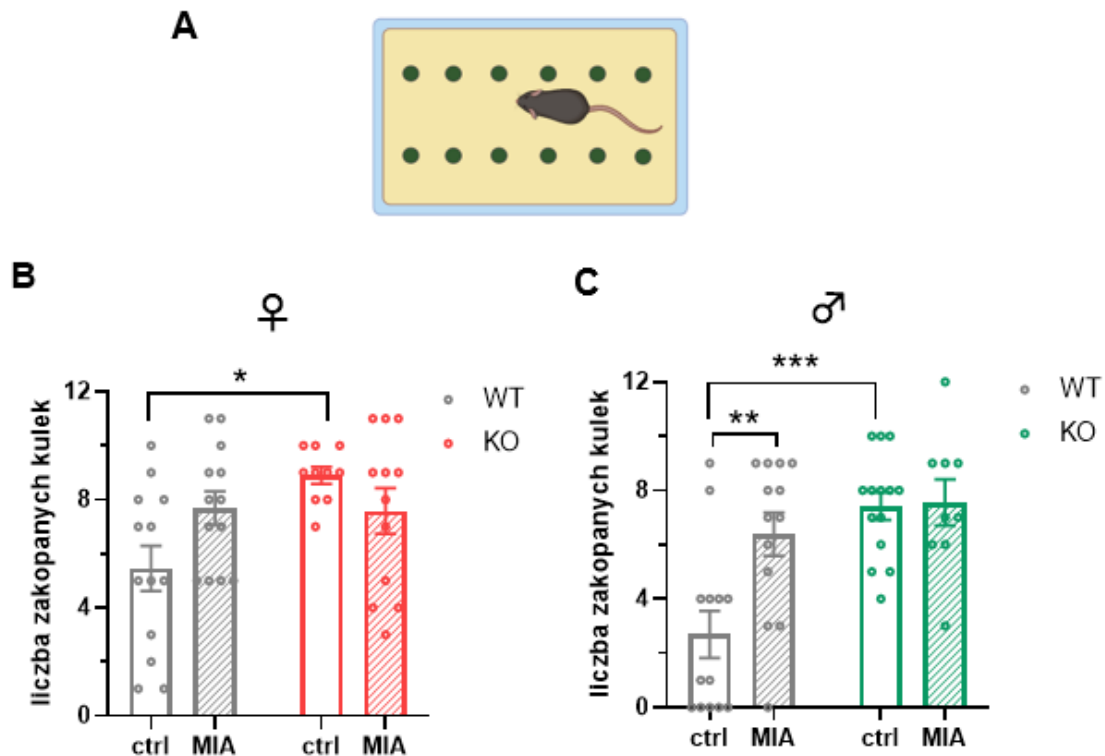
Ryc. 22. Wpływ MIA i/lub delecji genu *Lcn2* na zainteresowanie społecznym bodźcem zapachowym w teście trójkomorowym w zależności od płci. A Schemat eksperymentu. Opis w tekście. **B, C** Wskaźnik preferencji zapachu społecznego samic (**B**) i samców (**C**) obliczony według wzoru $I_s = (T_s - T_{Ns}) / (T_s + T_{Ns})$, gdzie I_s – wskaźnik preferencji zapachu społecznego, T_s – czas spędzony na oddziaływaniu z koszykiem z bodźcem społecznym (węszenie, wspinanie się), T_N – czas spędzony na oddziaływaniu z koszykiem z bodźcem kontrolnym. Dane przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, samice WT ctrl $n=12$, WT MIA $n=13$, KO ctrl $n=10$, KO MIA $n=12$; samce WT ctrl $n=12$, WT MIA $n=13$, KO ctrl $n=12$, KO MIA $n=8$. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji z testem *post hoc* Tukey'a, gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami: * $p<0,05$, *** $p<0,001$.

4.3.4.2. Analiza zachowania myszy w teście zakopywania kulek

W celu oceny wpływu aktywacji układu odpornościowego matki oraz delekcji genu *Lcn2* na wystąpienie zachowań powtarzalnych, obserwowanych m.in. u osób z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, przeprowadzono test zakopywania kulek. Myszy wykazują naturalną skłonność do kopania i zakopywania, jednak nasilenie tych zachowań może modelować występowanie zachowań powtarzalnych. Podczas doświadczenia mysz umieszczano na 15 min w klatce wypełnionej ściółką, na powierzchni której znajdowało się 12 szklanych kulek (Ryc. 23A). W teście tym porównywano zachowanie myszy o genotypie dzikim i z delecją genu *Lcn2* poddanych procedurze MIA oraz kontrolnych, a mierzonym parametrem była liczba zakopanych kulek.

W analizie statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji, która wykazała istotne statystycznie różnice w liczbie zakopanych kulek u obu płci (Ryc. 23B, C). Zarówno u samic jak i samców wykazano istotność czynnika genotypu (samice: $F(1, 44) = 5,283$, $p=0,0263$; samce: $F(1, 45) = 14,80$, $p=0,0004$) jak i interakcji między czynnikami (samice $F(1, 44) = 5,997$, $p=0,0184$; samce: $F(1, 45) = 5,390$, $p=0,0248$). W przypadku samców dodatkowo zaobserwowano istotny wpływ czynnika procedury ($F(1, 45) = 6,185$; $p=0,0167$), czego nie stwierdzono u samic. U obu płci myszy kontrolne o genotypie KO zakopały więcej kulek w porównaniu z myszami dzikimi (test *post hoc* Tukey'a, WT ctrl vs. KO ctrl, samice: $p=0,0107$, Ryc. 23B; samce $p=0,0002$, Ryc. 23C). U samców zaobserwowano ponadto zwiększenie liczby zakopanych kulek u myszy dzikich, których matki w ciąży otrzymywały zastrzyki LPS (WT ctrl vs. WT MIA: $p=0,0048$, Ryc. 23C).

Test zakopywania kulek



Ryc. 23. Wpływ MIA i/lub delecji genu *Lcn2* na zachowanie myszy w teście zakopywania kulek w zależności od płci. **A** Schemat klatki z kulkami. **B, C** Liczba zakopanych kulek u samic (**B**) i samców (**C**). Na obu wykresach dane przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, samice WT ctrl $n=13$, WT MIA $n=13$, KO ctrl $n=10$, KO MIA $n=12$; samce WT ctrl $n=13$, WT MIA $n=13$, KO ctrl $n=14$, KO MIA $n=9$. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji, z testem *post hoc* Tukey'a. Gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

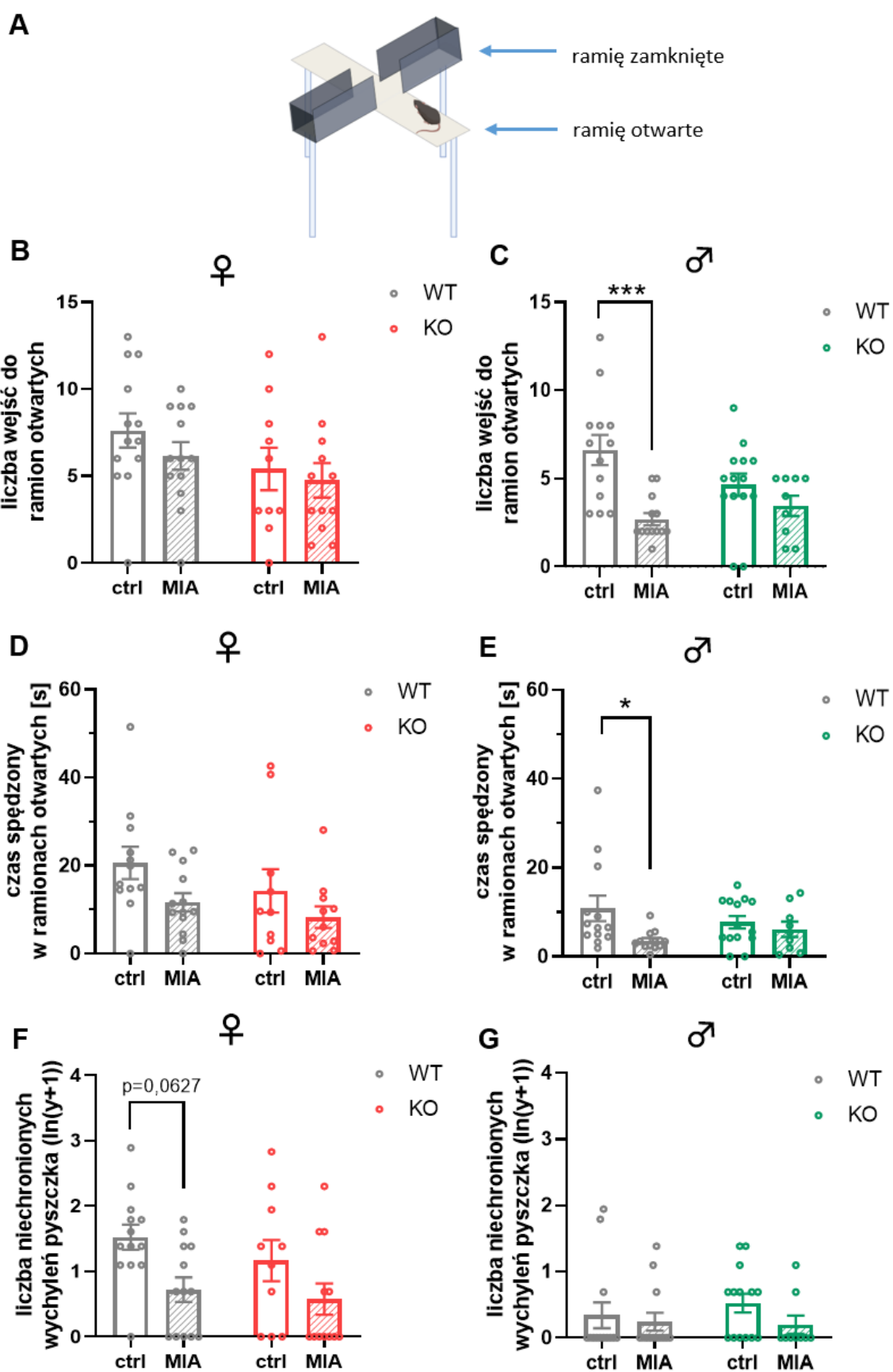
4.3.4.3. Analiza zachowania myszy w teście podwyższonego labiryntu krzyżowego

Aby zbadać wpływ delecji genu *Lcn2* oraz procedury MIA na występowanie zaburzeń lękowych przeprowadzono test podwyższonego labiryntu krzyżowego, który bazuje na naturalnej awersji gryzoni do eksplorowania podwyższonych i otwartych przestrzeni. W teście tym wykorzystano labirynt krzyżowy zbudowany z dwóch ramion posiadających ścianki – ramiona zamknięte – oraz dwóch ramion pozbawionych ścianek – ramiona otwarte (Ryc. 24A). Analizowano liczbę wejść oraz czas przebywania myszy w ramionach otwartych, a także liczbę niechronionych wychyleń pyszczka myszy poza granice ramion otwartych. Im mniejsza aktywność zwierząt w ramionach otwartych tym większy poziom lęku.

W przypadku samic dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała brak istotnych różnic między badanymi grupami w liczbie wejść do ramion otwartych labiryntu (Ryc. 24B). W analizie czasu spędzonego w ramionach otwartych ze względu na brak normalności uzyskanych danych zastosowano analizę wariancji ART (ang. *Aligned Rank Transform ANOVA*), która wykazała istotność czynnika genotypu ($F(1, 42) = 4,8492, p=0,0332$) a także procedury ($F(1, 42) = 4,6008, p=0,0378$), lecz nie wykazała interakcji między nimi. W teście *post hoc* Tukey'a nie zaobserwowano jednak istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami (Ryc. 24D). Przy ocenie wpływu MIA i delekcji genu *Lcn2* na liczbę niechronionych wychyleń pyszczka myszy zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji, która również wykazała istotność czynnika procedury ($F(1, 44) = 9,078, p=0,0043$). Dalsza analiza testem *post hoc* Tukey'a wykazała tendencję w kierunku zmniejszenia liczby niechronionych wychyleń pyszczka spowodowaną procedurą MIA u samic o genotypie dzikim (WT ctrl vs. WT MIA: $p=0,0627$, Ryc. 24F).

U samców czynnikiem różnicującym liczbę wejść do ramion otwartych była procedura (dwuczynnikowa analiza wariancji, $F(1, 45) = 15,04; p=0,0003$), oraz interakcja między czynnikami ($F(1, 45) = 4,257, p=0,0449$). Zaobserwowano znaczące zmniejszenie częstotliwości wejść do ramion otwartych labiryntu u myszy dzikich po procedurze MIA w porównaniu do myszy dzikich kontrolnych (test *post hoc* Tukey'a, WT ctrl vs. WT MIA: $p=0,0004$, Ryc. 24C). Podobne wyniki uzyskano badając czas spędzony w ramionach otwartych. Analiza wariancji ART (zastosowana ze względu na brak normalności uzyskanych danych) ujawniła istotny wpływ czynnika procedury ($F(1, 45) = 6,1252, p=0,0172$), ale brak wpływu genotypu i interakcji. W teście *post hoc* Tukey'a wykazano istotne zmniejszenie czasu spędzonego w ramionach otwartych labiryntu u myszy dzikich w efekcie procedury MIA (WT ctrl vs. WT MIA: $p=0,0352$, Ryc. 24E). Nie zaobserwowano jednak istotnych różnic w liczbie niechronionych wychyleń pyszczka u badanych grup samców (Ryc. 24G).

Test podwyższonego labiryntu krzyżowego

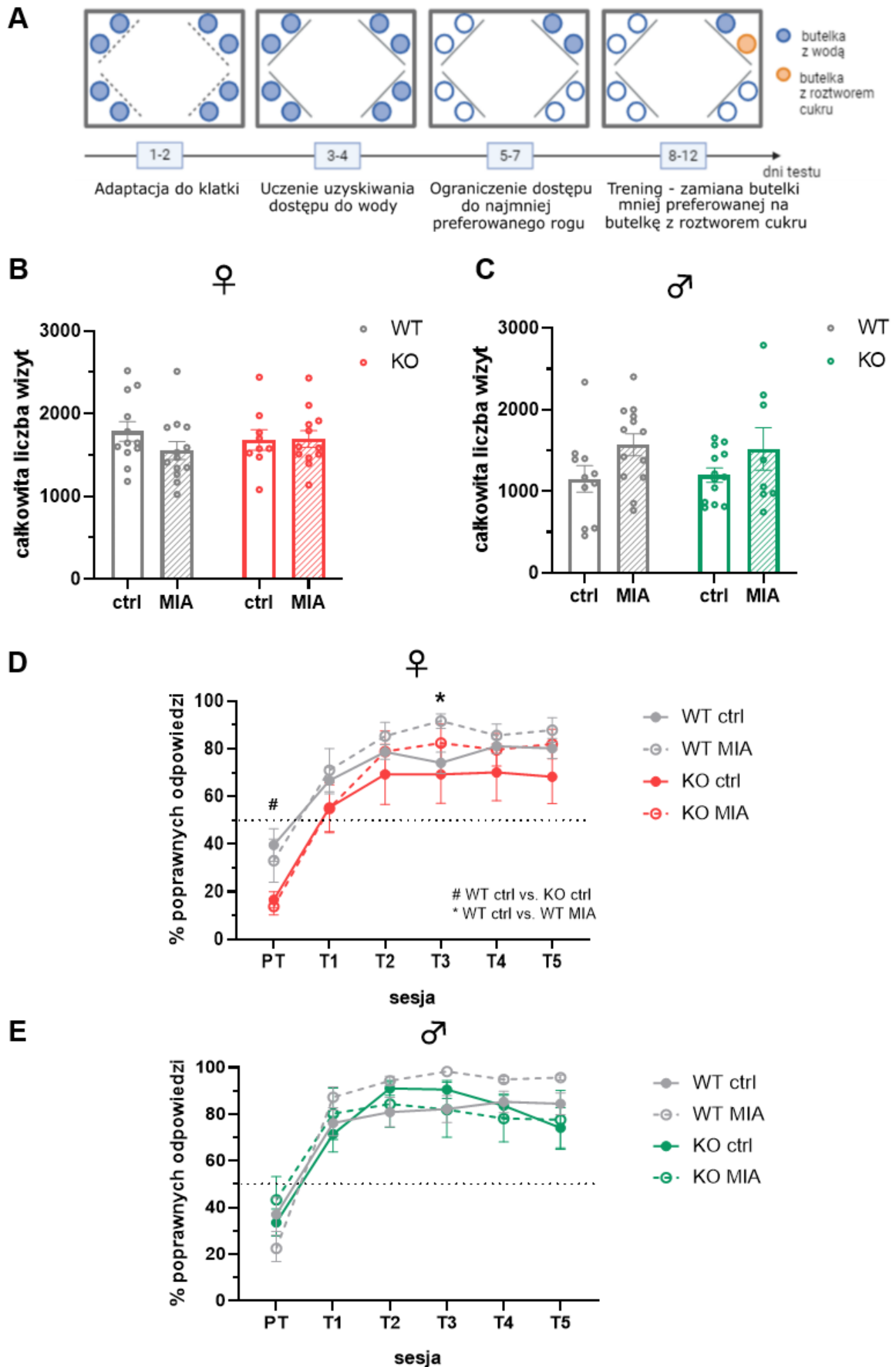


Ryc. 24. Wpływ MIA i/lub delecji genu *Lcn2* na zachowanie myszy w teście podwyższonego labiryntu krzyżowego w zależności od płci. **A** Schemat podwyższonego labiryntu krzyżowego. **B, C** Liczba wejść samic (**B**) i samców (**C**) do ramion otwartych labiryntu. **D, E** Czas spędzony przez samice (**D**) i samców (**E**) w ramionach otwartych labiryntu. **F, G** Liczba niechronionych wychyleń pyszczka samic (**F**) i samców (**G**) poza platformę. Dane zostały poddane przekształceniu logarytmicznemu $Y = \ln(1+Y)$. Na wszystkich wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, samice WT ctrl n=13, WT MIA n=13, KO ctrl n=10, KO MIA n=12; samce WT ctrl n=13, WT MIA n=13, KO ctrl n=14, KO MIA n=9. W B, C, F i G zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji, z testem *post hoc* Tukey'a. W D i E zastosowano analizę wariancji ART (Aligned Rank Transform ANOVA) z testem *post hoc* Tukey'a. Gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami *p<0,05, ***p<0,001.

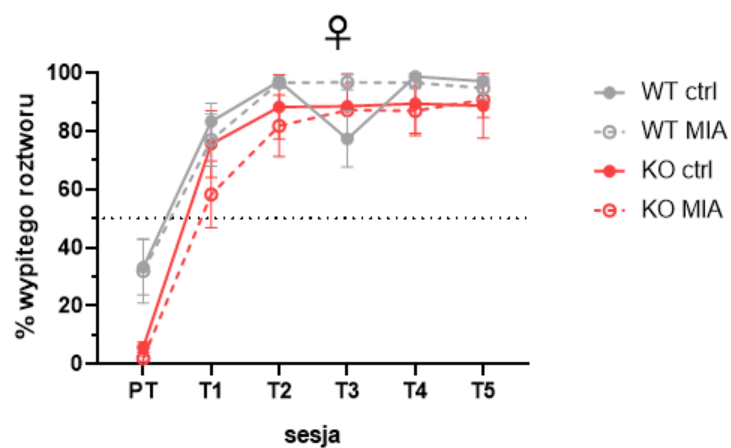
4.3.4.4. Analiza zachowania myszy podczas treningu apetytywnego w klatce IntelliCage

W celu oceny wpływu wyciszenia genu *Lcn2* oraz iniekcji LPS w okresie prenatalnym na występowanie zaburzeń poznawczych przeprowadzono eksperyment z wykorzystaniem klatki IntelliCage. W badaniu zastosowano trening motywowany apetytywnie, polegający na wykształceniu przez myszy preferencji do butelki zawierającej słodką wodę (10% roztwór sacharozy), będącą bodźcem pozytywnym. Schemat eksperymentu przedstawiono na rycinie 25A. Doświadczenie rozpoczynało się od dwudniowego okresu adaptacji do klatki, podczas którego drzwiczki do butelek były otwarte, a dostęp do wody we wszystkich rogach był swobodny. Następnie drzwiczki do butelek zostały zamknięte, a zwierzęta przez dwa kolejne dni uczyły się uzyskiwania dostępu do wody, który następował po wykonaniu puknięcia nosem. W kolejnym trzydniowym etapie dostęp do wody został ograniczony do jednego, najrzadziej odwiedzanego rogu. Ostatnim etapem był pięciodniowy trening apetytywny rozróżniania położenia butelek, podczas którego butelka, do której zwierzęta w poprzednim etapie wykonały mniej puknięć nosem została wymieniona na butelkę z 10% roztworem cukru. Analizowano aktywność zwierząt, proces uczenia się rozróżniania butelek z niesłodzoną i słodką wodą, preferencję słodkiej wody oraz motywację do znajdowania nagrody. Uzyskane wyniki zaprezentowano na rycinach 25B-I. Aktywność zwierząt przedstawiono jako liczbę wizyt we wszystkich rogach w trakcie trwania całego eksperymentu. Dwuczynnikowa analiza wariancji nie wykazała istotnych różnic w aktywności badanych samic (Ryc. 25B). W przypadku samców wykazano istotność czynnika procedury ($F(1, 41) = 5,680$; $p=0,0219$), jednak analiza *post hoc* testem Tukey'a nie wskazała na istnienie istotnych różnic między badanymi grupami zwierząt (Ryc. 25C).

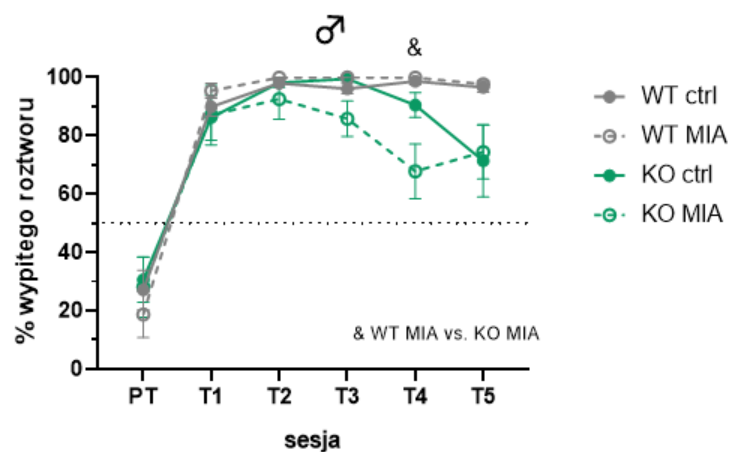
Trening apetytywny w klatce IntelliCage



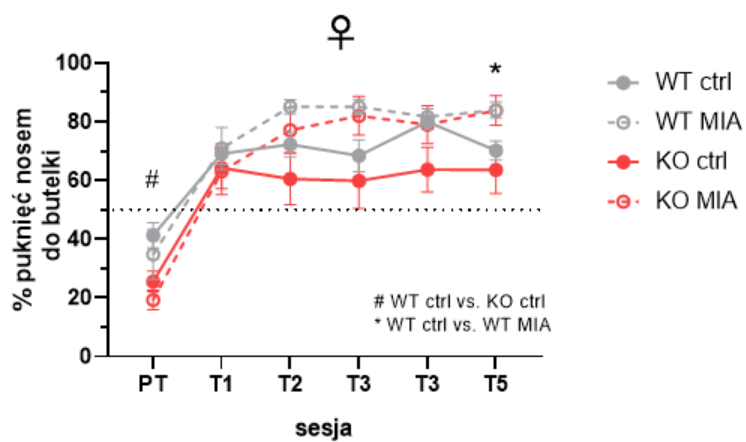
F



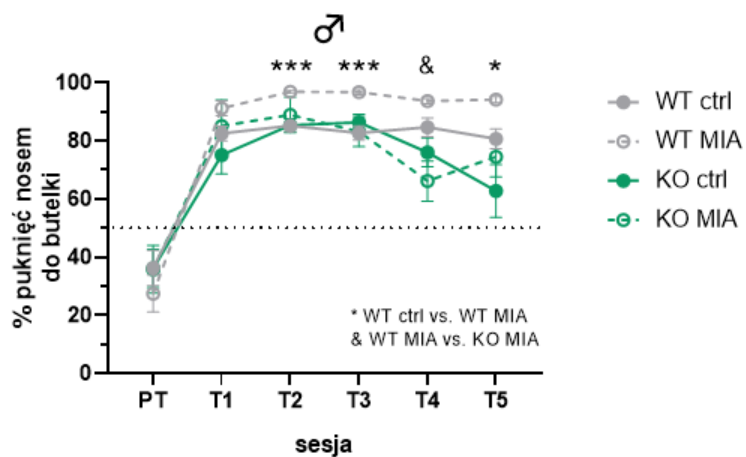
G



H



I



Ryc. 25. Wpływ MIA i/lub delekcji genu *Lcn2* na uczenie się motywowane apetytywnie w klatce IntelliCage w zależności od płci. A Schemat eksperymentu w klatce IntelliCage. Opis w tekście. **B, C** Całkowita aktywność samic (**B**) i samców (**C**) przedstawiona jako liczba wizyt we wszystkich rogach w trakcie trwania całego eksperymentu. **D, E** Uczenie apetytywne samic (**D**) i samców (**E**) przedstawione jako procent poprawnych odpowiedzi, czyli wizyt, podczas których pierwsze puknięcie nosem było skierowane do drzwiczek prowadzących do butelki z roztworem cukru w stosunku do całkowitej liczby wizyt w tym rogu w danej sesji. **F, G** Preferencja słodkiej wody samic (**F**) i samców (**G**) wyrażona jako procent wypitego roztworu cukru (mierzonego jako liczba liżnięć) do całkowitej ilości wypitych płynów w danej sesji. **H, I** Motywacja do znajdowania nagrody samic (**H**) i samców (**I**) wyrażona jako procent puknięć nosem dających dostęp do butelki z cukrem do wszystkich puknięć nosem w tym rogu w danej sesji. PT – wizyty z trzech dni poprzedzających trening apetytywny, gdy w rogu znajdowały się butelki z wodą, T1 – T5 – wizyty z kolejnych dni sesji treningowej. Dane przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ błąd standardowy, samice WT ctrl n=12, WT MIA n=13, KO ctrl n=9, KO MIA n=12; samce WT ctrl n=11, WT MIA n=13, KO ctrl n=13, KO MIA n=8. Zastosowano trójczynnиковą analizę wariancji z testem *post hoc* Tukey’a. Symbolami oznaczono poziom istotności różnic między grupami #p<0,05 dla WT ctrl vs. KO ctrl, *p<0,05 i ***p<0,001 dla WT ctrl vs. WT MIA, &p<0,05 dla WT MIA vs. KO MIA.

Proces uczenia apetytywnego, czyli uczenia się rozróżniania butelek z wodą i 10% roztworem sacharozy wyrażono jako procent poprawnych odpowiedzi, czyli wizyt, podczas których pierwsze puknięcie nosem było skierowane do drzwiczek prowadzących do butelki z roztworem cukru w stosunku do całkowitej liczby wizyt w tym rogu w danej sesji. Analizowano dane z trzech dni poprzedzających trening apetytywny (PT - przed treningiem, uśrednione dane) oraz dane z pięciu kolejnych dni sesji treningowej (T1, T2, T3, T4, T5). W analizie statystycznej zastosowano trójczynnиковą analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami, uwzględniając czynnik procedury (ctrl i MIA), genotypu (WT i KO) oraz sesji (PT, T1, T2, T3, T4, T5), która w przypadku samic wykazała istotność czynnika sesji ($F(2,448, 102,8) = 89,93, p < 0,0001$) oraz interakcji sesji i procedury ($F(5, 210) = 2,388, p = 0,0392$). Test *post hoc* Tukey’a nie wykazał jednak istotnych różnic pomiędzy grupami w uczeniu się z wyjątkiem trzeciego dnia treningu (T3), w którym samice o genotypie dzikim po procedurze MIA wykonały więcej poprawnych odpowiedzi, w porównaniu do samic z grupy kontrolnej (T3 - WT ctrl vs. WT MIA: $p = 0,0211$, Ryc. 25D). Zaobserwowano także różnicę w preferencji butelek przed treningiem – samice KO z grupy kontrolnej rzadziej wykonywały pierwsze puknięcie nosem do butelki, którą później wymieniono na butelkę z roztworem cukru (PT – WT ctrl vs. KO ctrl: $p = 0,0378$). Należy także zaznaczyć, że u wszystkich badanych grup samic zaobserwowano istotny wzrost

procenta poprawnych odpowiedzi przed treningiem w porównaniu do ostatniej sesji treningu, co oznacza, że myszy nauczyły się lokalizacji butelki ze słodką wodą (WT ctrl – PT vs. T5: $p=0,001$, WT MIA – PT vs. T5: $p=0,0005$, KO ctrl – PT vs. T5: $p=0,0056$, KO MIA – PT vs. T5: $p<0,0001$; poziomy istotności nie zaznaczone na wykresie).

W przypadku samców zastosowano analogiczną analizę statystyczną, która wykazała, że na uczenie apetytywne znacząco wpływa czynnik sesji ($F(2,567, 105,2) = 88,58$, $p<0,0001$), interakcji sesji i genotypu ($F(5, 205) = 3,163$, $p=0,0090$) oraz interakcji sesji, genotypu i procedury ($F(5, 205) = 3,925$, $p=0,0020$). Dalsza analiza wyników testem *post hoc* Tukey'a nie wykazała jednak istotnych różnic w uczeniu się pomiędzy grupami (Ryc. 25E). Zaobserwowano jednak, podobnie jak w przypadku samic, istotny statystycznie wzrost procenta poprawnych odpowiedzi po treningu u wszystkich badanych grup samców (WT ctrl – PT vs. T5: $p=0,0016$, WT MIA – PT vs. T5: $p<0,0001$, KO ctrl – PT vs. T5: $p=0,0334$, KO MIA – PT vs. T5: $p=0,0430$; poziomy istotności nie zaznaczone na wykresie). Uzyskane wyniki sugerują, że zarówno w przypadku samic jak i samców wszystkie badane grupy zwierząt nauczyły się rozróżniania butelki ze słodką i niesłodzoną wodą, a procent poprawnych odpowiedzi w trakcie trwania treningu był zbliżony we wszystkich badanych grupach.

Aby potwierdzić, że 10% roztwór cukru jest dla badanych myszy bodźcem apetytywnym analizowano preferencję słodkiej wody, którą przedstawiono jako procent wypitego roztworu cukru (mierzonego jako liczba liżnięć) do całkowitej ilości wypitych płynów w danej sesji. U samic trójczynnikiowa analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami wykazała, że na preferencję słodkiej wody istotnie wpływa czynnik sesji ($F(2,198, 92,32) = 104,2$; $p<0,0001$), genotypu ($F(1, 42) = 4,195$, $p=0,0468$) oraz interakcji między nimi ($F(5, 210) = 2,955$, $p=0,0134$). W teście *post hoc* Tukey'a nie odnotowano jednak różnic między badanymi grupami w żadnym dniu treningu (Ryc. 25F). We wszystkich badanych grupach zwierząt wykazano natomiast znaczący wzrost ilości wypitych płynów z butelki zawierającej słodką wodę w porównaniu do etapu przed treningiem, kiedy w butelce znajdowała się woda niesłodzona (WT ctrl – PT vs. T5: $p=0,0003$, WT MIA – PT vs. T5: $p=0,0009$, KO ctrl – PT vs. T5: $p=0,0005$, KO MIA – PT vs. T5: $p<0,0001$; poziomy istotności nie zaznaczone na wykresie).

W przypadku samców trójczynnikiowa analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami podobnie jak u samic wykazała istotność czynnika sesji ($F(2,297, 94,18) = 104,0$, $p < 0,0001$), genotypu ($F(1, 41) = 7,366$, $p = 0,0097$) oraz interakcji sesji i genotypu ($F(5, 205) = 4,624$, $p = 0,0005$). Wyniki testu *post hoc* Tukey'a wskazują jednak na brak różnic w preferencji słodkiej wody między badanymi grupami z wyjątkiem czwartego dnia treningu, w którym samce z grupy KO MIA wypili mniej słodkiego roztworu w porównaniu z samcami z grupy WT MIA (T4 - WT MIA vs. KO MIA, $p = 0,0435$, Ryc. 25G). Podobnie jak u samic zaobserwowano także, że wszystkie badane grupy samców piły znacząco więcej z butelki zawierającej 10% roztwór cukru w porównaniu do okresu przed treningiem, w którym butelka zawierała wodę bez cukru (WT ctrl – PT vs. T5: $p < 0,0001$, WT MIA – PT vs. T5: $p < 0,0001$, KO ctrl – PT vs. T5: $p = 0,049$, KO MIA – PT vs. T5: $p = 0,0379$; poziomy istotności nie zaznaczone na wykresie). Wyniki te potwierdzają, że słodka woda była dla myszy bodźcem apetytywnym, gdyż zwierzęta obu płci ze wszystkich analizowanych grup preferowały pić z butelki zawierającej 10% roztwór sacharozy. Ponadto poziom preferencji był porównywalny we wszystkich badanych grupach zwierząt.

Kolejnym badanym parametrem była motywacja do znajdowania nagrody, wyrażona jako procent puknięć nosem dających dostęp do butelki z cukrem w stosunku do wszystkich puknięć nosem w tym rogu w danej sesji. Trójczynnikiowa analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami u samic wykazała znaczenie czynnika sesji ($F(2,484, 104,3) = 83,58$; $p < 0,0001$) oraz interakcji sesji i procedury ($F(5, 210) = 6,799$, $p < 0,0001$). Wśród wszystkich grup badanych samic stwierdzono podobną motywację do znajdowania nagrody (test *post hoc* Tukey'a). Wyjątkiem były jednak samice dzikie po procedurze MIA, które ostatniego dnia treningu wykonały więcej puknięć nosem do butelki z cukrem w porównaniu do samic kontrolnych (T5 – WT ctrl vs. WT MIA: $p = 0,0190$, Ryc. 25H) oraz wykazywały tendencję w kierunku zwiększonej motywacji trzeciego dnia treningu (T3 – WT ctrl vs. WT MIA: $p = 0,0591$, Ryc. 25H). Zaobserwowano także różnicę w preferencji butelek przed treningiem – samice KO z grupy kontrolnej rzadziej wykonywały puknięcia nosem do butelki, którą później wymieniono na butelkę z roztworem cukru (PT – WT ctrl vs. KO ctrl: $p = 0,0463$). Odnotowano również zwiększoną motywację w trakcie treningu w porównaniu do okresu sprzed treningu we wszystkich grupach samic (WT ctrl – PT vs.

T5: $p=0,0053$, WT MIA – PT vs. T5: $p=0,0008$, KO ctrl – PT vs. T5: $p=0,0006$, KO MIA – PT vs. T5: $p<0,0001$; poziomy istotności nie zaznaczone na wykresie).

Trójczynnikiowa analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami u samców również wykazała, że największy wpływ na motywację ma czynnik sesji ($F(2,547, 104,4) = 90,04$, $p<0,0001$), ale też genotypu ($F(1, 41) = 7,434$, $p=0,0094$) oraz interakcji sesji i genotypu ($F(5, 205) = 4,126$, $p=0,0014$). Zaobserwowano, że dzięki samce, których matki przeszły infekcję w ciąży wykazywały zwiększoną motywację do zdobycia nagrody w porównaniu do samców dzikich kontrolnych w drugim, trzecim i piątym dniu treningu (test *post hoc* Tukey'a, WT ctrl vs. WT MIA – T2: $p=0,0005$, T3: $p=0,0007$, T5: $p=0,0124$; Ryc. 25I). Stwierdzono również zmniejszoną liczbę puknięć nosem do butelki z cukrem w czwartym dniu treningu u samców z delecją genu *Lcn2* po procedurze MIA w porównaniu do samców WT MIA (T4 - WT MIA vs. KO MIA: $p=0,0205$). Tak jak w przypadku samic odnotowano także wzrost procenta puknięć nosem do strony z cukrem w trakcie treningu w porównaniu do etapu przed treningiem, kiedy butelka była wypełniona wodą bez cukru (WT ctrl – PT vs. T5: $p=0,0032$, WT MIA – PT vs. T5: $p<0,0001$, KO ctrl – PT vs. T5: $p=0,051$, KO MIA – PT vs. T5: $p=0,0242$; poziomy istotności nie zaznaczone na wykresie).

5. Dyskusja

W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że aktywacja układu odpornościowego matki powoduje wzrost ekspresji mRNA *Lcn2* w mózgu płodów, a u dorosłych myszy wywołuje zmiany gęstości i kształtu kolców dendrytycznych oraz pobudliwości neuronów piramidowych hipokampa, czemu towarzyszą zaburzenia zachowania przypominające objawy zaburzeń neurorozwojowych. Co ciekawe, sama delecja genu *Lcn2* w warunkach kontrolnych powodowała analogiczne do występujących u potomstwa po MIA deficyty behawioralne. Potwierdzono także, że *Lcn2* ulega ekspresji w rozwijającym się mózgu w warunkach fizjologicznych, jednak nie zaobserwowano istotnego wpływu wyciszenia genu *Lcn2* na zachowanie zwierząt, których matki w ciąży otrzymywały zastrzyki LPS. Przedstawione wyniki nie pozwalają jednoznacznie określić roli białka *Lcn2* w rozwoju zaburzeń wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki, jednak wskazują na jego istotne znaczenie dla prawidłowego rozwoju mózgu w warunkach fizjologicznych.

5.1. Model badawczy MIA

Aby odpowiedzieć na pytanie w jaki sposób infekcja w ciąży wpływa na rozwój mózgu zastosowano model aktywacji układu odpornościowego matki, w którym ciężarne myszy otrzymywały zastrzyki LPS w dawce 50 µg/kg od 16 do 18 dnia ciąży. Rozwój mózgu to proces niezwykle złożony i precyzyjnie regulowany w czasie. Moment, w którym aktywowany jest układ odpornościowy matki, ma wpływ na to, które procesy rozwojowe w mózgu płodu mogą zostać zaburzone. Część metaanaliz badań epidemiologicznych wskazuje, że infekcje szczególnie w drugim trymestrze ciąży wiążą się z większym ryzykiem wystąpienia zaburzeń neurorozwojowych (Jiang i in., 2016; Saatci i in., 2021). W związku z tym w niniejszej rozprawie podawanie LPS ciężarnym myszom zaplanowano na czas w przybliżeniu odpowiadający drugiemu trymestrowi ciąży u ludzi (Clancy i in., 2007; Semple i in., 2013). LPS, w przeciwieństwie do żywych patogenów, wywołuje ograniczoną w czasie odpowiedź immunologiczną (Meyer i in., 2009), dlatego też wybrano model trzykrotnego podania, aby lepiej odwzorować przebieg infekcji u człowieka. Co ciekawe, długotrwałe infekcje w ciąży, szczególnie te wymagające hospitalizacji, mogą w większym stopniu zwiększać prawdopodobieństwo diagnozy NDDs u potomstwa (Atladóttir i in., 2012; Jiang i in., 2016). Ponadto, wielokrotne podanie LPS pozwala na uwzględnienie

wpływu MIA większą liczbę procesów rozwojowych, które są kluczowe dla tworzenia połączeń nerwowych. Okres między 16 a 18 dniem rozwoju embrionalnego myszy przypada na intensywną neurogenezę, zwłaszcza w hipokampie (Khalaf-Nazzal i Francis, 2013). Wtedy pojawiają się także pierwsze niedojrzałe synapsy (Li i in., 2010) i rozpoczyna się proces różnicowania astrocytów (Farhy-Tselnicker i Allen, 2018). Należy jednak pamiętać, że wielokrotne podanie LPS może prowadzić do wytworzenia swego rodzaju tolerancji immunologicznej, polegającej na osłabieniu obwodowej reakcji zapalnej po kolejnych podaniach substancji w porównaniu z reakcją wywoływaną przez pierwszą ekspozycję (Chen i in., 2005; Fan i Cook, 2004).

Kolejną kwestią związaną z zastosowaniem iniekcji LPS jest fakt, że substancja ta jest izolowana z bakterii, w związku z tym lipopolisacharydy otrzymywane z różnych serotypów bakterii, a nawet różne serie LPS w obrębie tego samego serotypu, mogą charakteryzować się odmiennymi właściwościami pirogennymi i cytokinogennymi (Akarsu i Mamuk, 2007; Ray i in., 1991). Fakt ten wpływa na ograniczone możliwości bezpośredniego porównywania dawek (w przeliczeniu na mg/kg m. c.) między poszczególnymi laboratoriami. W niniejszej pracy wybór dawki i częstotliwości podawania został dokonany na podstawie badania pilotażowego, w którym zastosowanie takiego protokołu wiązało się z istotnym wzrostem ekspresji mRNA *Lcn2* w mózgach płodów, przy akceptowalnej liczbie poronień.

5.2. *Lcn2* ulega ekspresji w mózgu myszy już w rozwoju prenatalnym, a poziom mRNA *Lcn2* w mózgu płodu rośnie pod wpływem aktywacji układu odpornościowego matki

Mimo licznych dowodów epidemiologicznych i z badań na zwierzętach wskazujących na związek aktywacji układu odpornościowego matki z występowaniem zaburzeń neurorozwojowych, mechanizmy leżące u podstaw tych zjawisk wciąż pozostają niewyjaśnione. W ramach niniejszej pracy testowano hipotezę, że białko *Lcn2* może być potencjalnie zaangażowane w te procesy. *Lcn2* to wielofunkcyjne białko, związane przede wszystkim z układem odpornościowym, którego ekspresja jest silnie indukowana pod wpływem infekcji, stanu zapalnego czy uszkodzenia narządów (Lin i in., 2024; Romejko i in., 2023; Zhao i in., 2016). W modelach zwierzęcych wykazano, że ekspresja *Lcn2* rośnie także w mózgu dorosłych myszy po dootrzewnowym podaniu LPS (Hamzic i in., 2013; Kang i in., 2018; Marques i in., 2008). W ostatnich latach coraz więcej danych wskazuje, że *Lcn2*

jest także zaangażowana w regulację funkcji i morfologii neuronów i komórek glejowych w dorosłym mózgu, a także bierze udział w regulacji zachowania zwierząt (Ferreira i in., 2013, 2018; Kim i in., 2024; Lee i in., 2009; Mosialou i in., 2017; Mucha i in., 2011). Co istotne, wskazano także, że gen *Lcn2* jest przypuszczalnie związany z plastycznością neuronalną, a mutacje prowadzące do utraty funkcji w tym genie u ludzi mogą zwiększać ryzyko zaburzeń neuropsychiatrycznych (Smith i in., 2017). Dlatego też zdecydowano się na zbadanie roli tego białka w procesach zachodzących w mózgu płodu pod wpływem aktywacji układu odpornościowego matki.

Aby lepiej zrozumieć potencjalną rolę *Lcn2* w procesach neurozwojowych postanowiono w pierwszej kolejności zbadać ekspresję mRNA *Lcn2* w rozwijającym się mózgu gryzoni. W tym celu wykorzystano RNA wyizolowane z hipokampów myszy szczepu dzikiego C57BL/6J obu płci w różnym wieku, poczynawszy od płodów E16 do osobników dorosłych, aby następnie przeprowadzić reakcję RT-qPCR. Analiza ta po raz pierwszy wykazała ekspresję *Lcn2* w rozwijającym się mózgu myszy w warunkach fizjologicznych. Najniższą ekspresję mRNA *Lcn2* w hipokampie odnotowano w E16. Poziom ekspresji tego genu wzrastał do momentu narodzin, w którym osiągnął wartość maksymalną, a następnie zaczął spadać w rozwoju postnatalnym (P7) i utrzymywał się na podobnym poziomie do dorosłości. Zmiany ekspresji *Lcn2* w rozwijającym się mózgu sugerują, że białko to może pełnić ważne funkcje w rozwoju tego narządu. Co ciekawe, ekspresję *Lcn2* wykazano również w rozwijającym się mózgu u ludzi (Zhang i in., 2012), a także w zarodkach ryby danio pręgowany (Lee i in., 2009), co może wskazywać na podobną rolę tego białka w rozwoju mózgu u różnych gatunków.

W dalszej części pracy oceniono, czy aktywacja układu odpornościowego matki spowoduje zmiany ekspresji *Lcn2* w mózgu potomstwa. Zaobserwowano, że iniekcje LPS spowodowały indukcję ekspresji mRNA *Lcn2* w korze i hipokampie płodów E19 obu płci, 24 godziny po ostatnim zastrzyku. Dotychczas nie pokazano wzrostu ekspresji *Lcn2* w mózgu płodów w odpowiedzi na MIA, chociaż w niedawno opublikowanym badaniu zaobserwowano podwyższony poziom tego białka we krwi i hipokampie myszy na wczesnym etapie rozwoju postnatalnego (P4), dobę po infekcji bakteryjnej *Staphylococcus epidermidis* (Gravina i in., 2023). Co ciekawe, barwienie immunofluorescencyjne wskazało na lokalizację *Lcn2* głównie w obrębie komórek

śródbłonna naczyń mózgu, a zwiększona ekspresja *Lcn2* pozytywnie korelowała z reaktywną astrocytozą oraz zmianami w układzie naczyniowym mózgu.

5.3. MIA indukuje ekspresję cytokin prozapalnych w łożysku i mózgu płodów, a efekty te są zależne od genotypu i płci potomstwa

W celu zbadania roli białka *Lcn2* w procesach leżących u podstaw zaburzeń rozwoju mózgu wywołanych MIA wykorzystano myszy transgeniczne z delecją genu *Lcn2*. Aby wyeliminować wpływ genotypu matki na efekty obserwowane u potomstwa, do krzyżowań wykorzystano samice o genotypie *Lcn2* Het, które rodzą potomstwo zarówno z genotypem WT, jak i KO.

W pierwszej kolejności oceniano wpływ MIA i delecji genu *Lcn2* na indukcję odpowiedzi zapalnej u zwierząt. W tym celu analizowano poziom ekspresji mRNA cytokin prozapalnych w łożyskach oraz przodomózgowiach i hipokampach płodów E18 obu płci, o genotypie WT i KO, cztery godziny po ostatniej iniekcji LPS lub soli fizjologicznej. Choć w niniejszej rozprawie nie analizowano stężenia cytokin prozapalnych w surowicy matki to wykazano, że trzykrotne podanie LPS skutkowało ponad 6-krotnym wzrostem ekspresji mRNA *Il-1β* w łożyskach pochodzących od samic WT i ponad 10-krotnym wzrostem w łożyskach pochodzących od samców WT. Zaobserwowano także ponad 2-krotne zwiększenie poziomu mRNA *TNF-α* w łożyskach pochodzących od płodów WT obu płci. Wynik ten wskazuje na silną odpowiedź zapalną łożyska, zróżnicowaną w zależności od płci rozwijającego się płodu. Jednocześnie nie wykazano istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA *Il-6*, mimo iż wcześniejsze badania podkreślają kluczową rolę tej cytokiny w rozwoju zaburzeń zachowania w modelach MIA (Samuelsson i in., 2006; Smith i in., 2007). Ponieważ w przedstawionym badaniu analizę zmian poziomu mRNA ograniczono do jednego punktu czasowego (4 godziny po ostatniej iniekcji); możliwe, że ewentualne istotne statystycznie zmiany ekspresji *Il-6* mogły zajść wcześniej lub później. Co istotne, Ashdown i współpracownicy (2006) wykazali, że pojedyncza dawka LPS (50 µg/kg) podana ciężarnym szczurom w 18. dniu ciąży podnosi stężenie *Il-6* w łożysku dopiero po 8 godzinach, a nie po 4 (Ashdown i in., 2006).

Iniekcje LPS skutkowały indukcją odpowiedzi zapalnej także w łożyskach pochodzących od płodów z delecją *Lcn2*. Podobnie jak u myszy WT wykazano indukowany MIA wzrost ekspresji *Il-1β*, jednak nie zaobserwowano zmian poziomu mRNA *TNF-α*. Z drugiej strony,

w łożyskach pochodzących od samic KO MIA stwierdzono wzrost ekspresji mRNA *Il-6*, co nie było widoczne u myszy dzikich.

Zarówno u ludzi jak i w modelach zwierzęcych wykazano, że cytokiny pełnią kluczową rolę pośredników między aktywacją układu odpornościowego matki a efektami jakie wywiera ona na rozwijający się płód. Jest to szczególnie istotne, biorąc pod uwagę, że zarówno LPS, jak i wiele patogenów wywołujących infekcję nie przenika przez barierę łożyskową (Ashdown i in., 2006; Robbins i Bakardjiev, 2012; Romero i in., 1987). Mechanizm w jakim matczyne cytokiny wpływają na rozwój mózgu płodu nie jest do końca wyjaśniony. Pokazano, że niektóre cytokiny mogą przenikać barierę łożyskową (Zaretsky i in., 2004), jednak coraz więcej danych wskazuje, że lokalna odpowiedź zapalna w samym łożysku także jest ważna dla efektów wywoływanych przez MIA. Łožysko nie tylko utrzymuje homeostazę immunologiczną między matką a płodem, ale także pełni kluczową funkcję odżywczą, dostarczając składniki odżywcze i tlen (Hsiao i Patterson, 2012; Tsukada i in., 2019).

Zastosowany w pracy model MIA spowodował także wzrost ekspresji cytokin prozapalnych w mózgach (przodomózgowiu i hipokampie) płodów o genotypie niezmienionym cztery godziny po ostatniej iniekcji, ale efekt ten był obecny jedynie u samców. Co ciekawe wykazano, że poziom mRNA *Lcn2* w przodomózgowiu i hipokampie płodów w odpowiedzi na iniekcje LPS również wzrósł jedynie u samców. Wynik ten różni się od rezultatów uzyskanych na myszach szczepu C57BL/6J, gdzie indukowane LPS zwiększenie ekspresji *Lcn2* zaobserwowano u płodów obu płci, jednak należy pamiętać, że poziom mRNA badano znacznie później, bo 24h godziny po ostatniej iniekcji. Sugeruje to, że indukcja ekspresji *Lcn2* w mózgach samic i samców może zachodzić w różnym czasie, w zależności od płci płodu.

Iniekcje LPS powodowały aktywację odpowiedzi zapalnej także w mózgu samców KO, jednak indukcja mRNA *Il-1 β* była słabsza w porównaniu do myszy WT, a wzrostu ekspresji *TNF- α* w odpowiedzi na iniekcje LPS nie wykazano. Co ciekawe, w doniesieniach literaturowych występują nieścisłości dotyczące regulacji odpowiedzi zapalnej indukowanej LPS u myszy *Lcn2* KO. Podczas gdy Kang i wsp. wykazali wzrost ekspresji cytokin prozapalnych w mózgu po iniekcji LPS u dorosłych myszy z delecją genu *Lcn2* (Kang i in., 2018), w innym badaniu nie wykazano istotnych różnic w indukowanej LPS

odpowiedzi zapalnej w mózgu u myszy WT i KO (Ip i in., 2011). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki sugerują, że słabsza indukcja mRNA cytokin *TNF-α* i *Il-1β* u myszy *Lcn2 KO* w porównaniu do myszy *WT* wskazuje na możliwą funkcję *Lcn2* jako promotora odpowiedzi zapalnej.

Biorąc pod uwagę, że cytokiny mają zdolność przenikania przez barierę krew-mózg (Banks i in., 1996, 2009) oraz fakt, że w modelach MIA wykazano obecność białek cytokin prozapalnych przy nieobecności ekspresji mózgowej (Meyer i in., 2006), dodatkowa analiza stężenia białek cytokin prozapalnych w mózgu umożliwiłaby szerszy wgląd w przebieg odpowiedzi zapalnej w mózgach płodów.

5.4. Aktywacja układu odpornościowego matki w rozwoju prenatalnym i delecja genu *Lcn2* wpływają na podstawowe właściwości elektrofizjologiczne neuronów glutaminergicznych hipokampa dorosłych myszy, a efekt ten jest zależny od płci

W niniejszej pracy skupiono się na badaniu właściwości elektrofizjologicznych i zmian morfologicznych neuronów hipokampa, ponieważ jest to obszar mózgu, którego struktura i funkcja często są zmienione w przypadku zaburzeń neurorozwojowych (Harrison, 2004; Li i in., 2019). U pacjentów z zaburzeniami neurorozwojowymi raportowano m.in. zmiany objętości hipokampa, zredukowaną złożoność drzewa dendrytycznego i gęstość kolców dendrytycznych czy zaburzenia ekspresji genów związanych z funkcjonowaniem synaps (Brambilla i in., 2003; Chapleau i in., 2009; Rexrode i in., 2024; Rosoklija i in., 2000). Co ważne, także w modelach zwierzęcych MIA wykazano, że potomstwo narażone na aktywację układu odpornościowego matki wykazuje zmiany w hipokampie, takie jak zaburzenia neurogenezy, deficyty funkcjonalne synaps czy upośledzenie plastyczności synaptycznej (Couch i in., 2021; Hui i in., 2020; Ito i in., 2010). Zaburzenia te są często związane z deficytami behawioralnymi, w tym z pogorszeniem pamięci przestrzennej i społecznym wycofaniem, co odzwierciedla typowe objawy zaburzeń neurorozwojowych.

Aby scharakteryzować podstawowe właściwości elektrofizjologiczne neuronów hipokampa przeprowadzono rejestracje elektrofizjologiczne na skrawkach mózgu, pochodzących od myszy dzikich i pozbawionych białka *Lcn2*, których matki w ciąży otrzymywały iniekcje LPS lub soli fizjologicznej. Wyniki tych badań ujawniły spadek pobudliwości własnej neuronów piramidowych pola CA1 hipokampa u samców poddanych MIA w porównaniu do osobników z grupy kontrolnej, a efektu tego nie

wykazano u samic. Różnice w pobudliwości najprawdopodobniej nie wynikały ze zmian aktywnych własności błony neuronalnej, gdyż nie stwierdzono wpływu MIA na właściwości parametrów potencjałów czynnościowych, takich jak potencjał progowy, szerokość połówkowa, amplituda i hiperpolaryzacja następcza. Spadek częstotliwości wyładowań może być jednak związany z zaobserwowanym obniżeniem oporu wejściowego. Pasywne własności błony komórkowej (takie jak opór wejściowy i potencjał spoczynkowy) zależą przede wszystkim od kanałów jonowych, które są przewodne dla jonów w stanie spoczynku – tzw. kanałów przeciekowych (ang. *leak channels*), takich jak np. kanały potasowe K_{2P} (ang. *two-pore domain potassium channels*) czy K_{ir} (ang. *inwardly rectifying potassium channels*) (Goldstein i in., 2001; Hibino i in., 2010). Wzrost ekspresji tych kanałów prowadzi do spadku pobudliwości własnej (Griego i in., 2022). Co ciekawe u potomstwa narażonego na MIA wykazano wzrost ekspresji genu *Kcnk1* kodującego jeden z kanałów potasowych należących do rodziny K_{2P} (Amodeo i in., 2019), a deregulacja funkcji kanałów jonowych K_{ir} została powiązana z kilkoma chorobami neuropsychiatrycznymi, w tym ADHD i schizofrenią (Jeremic i in., 2021).

Wpływ MIA na obniżenie pobudliwości własnej neuronów hipokampa wykazano także w modelu infekcji wirusowej u szczurów (Patrich i in., 2016). Podanie poly(I:C) w 15. dniu ciąży spowodowało zmniejszenie częstotliwości wyładowań neuronów, zarówno w hodowli neuronów hipokampa pochodzących od nowonarodzonego potomstwa MIA jak i w skrawkach mózgu młodych samców w wieku P14-P16, w neuronach piramidowych warstwy CA1. Obniżeniu pobudliwości komórek nerwowych towarzyszył także spadek oporu wejściowego. Należy jednak zaznaczyć, że w innych badaniach obserwowano także wzrosty pobudliwości neuronów w odpowiedzi na MIA (Griego i in., 2022; Zhang i van Praag, 2015). Rozbieżności te mogą wynikać z różnic w metodach eksperymentalnych zastosowanych w badaniach, m.in. typu substancji zastosowanej do wywołania MIA, dawki oraz czasu podania, badanych subpopulacji neuronalnych czy wieku zwierząt, w którym oceniano właściwości elektrofizjologiczne komórek nerwowych.

W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że także sama delecja genu *Lcn2* wpływa na podstawowe właściwości elektrofizjologiczne neuronów pobudzających hipokampa, a efekt ten również występuje jedynie u samców. Myszy pozbawione genu *Lcn2*, zarówno z grupy kontrolnej jak i poddane MIA, charakteryzowały się podwyższoną pobudliwością

własną komórek piramidowych pola CA1 hipokampa w porównaniu do myszy o genotypie prawidłowym. Wyniki te są spójne z danymi literaturowymi, które wykazują analogiczne zmiany u myszy *Lcn2* KO zarówno w hipokampie jak i w neuronach pobudzających jądra podstawno-bocznego ciała migdałowatego (ang. *basolateral amygdala*, BLA) (Mucha i in., 2011; Skrzypiec i in., 2013). Wzrost pobudliwości własnej u samców z delecją *Lcn2* mógł wynikać z zaobserwowanego podwyższenia potencjału spoczynkowego błony. Dodatkowo, potencjały czynnościowe samców z grupy KO MIA charakteryzowały się zmniejszeniem szerokości połówkowej w stosunku do samców WT MIA, co może sugerować wpływ delecji *Lcn2* na kompozycję, liczbę czy rozmieszczenie kanałów jonowych, których aktywność determinuje aktywne własności błony, a zwłaszcza fazę repolaryzacji potencjału czynnościowego, takich jak np. kanały jonowe potasowe zależne od potencjału (Bocksteins i in., 2012).

Warto także wspomnieć, że do tej pory wszystkie badania elektrofizjologiczne przeprowadzono jedynie na samcach myszy *Lcn2* KO, natomiast w niniejszej pracy doktorskiej scharakteryzowano właściwości elektrofizjologiczne myszy obu płci, przy czym u samic efekt ten nie wystąpił.

5.5. MIA i delecja genu *Lcn2* wpływają na gęstość i morfologię kolców dendrytycznych neuronów piramidowych hipokampa dorosłych myszy, a efekt jest zależny od płci

Kolce dendrytyczne, jako główne miejsca lokalizacji synaps pobudzających w mózgu odgrywają kluczową rolę dla prawidłowej komunikacji neuronalnej. Ich morfologia dynamicznie zmienia się pod wpływem aktywności neuronalnej zależnej od bodźców zewnętrznych, co z kolei wpływa na organizację obwodów neuronalnych. Nieprawidłowości gęstości i kształtu kolców dendrytycznych są fenotypem często obserwowanym w zaburzeniach neurorozwojowych i uważa się, że zmiany te mogą leżeć u podstaw patofizjologii tych zaburzeń (Gilman i in., 2011; Grant, 2012; Pekala i in., 2021).

Aby ocenić wpływ MIA na gęstość i morfologię kolców dendrytycznych w hipokampie przeprowadzono barwienie skrawków mózgu dorosłych myszy przy użyciu fluorescencyjnego lipofilowego barwnika Dil, który wbudowując się w błonę komórkową umożliwia wizualizację kształtu komórki. Wykazano, że aktywacja układu odpornościowego matki spowodowała spadek gęstości kolców dendrytycznych neuronów pola CA1 hipokampa u samic o genotypie dzikim. Efektu tego nie zaobserwowano

u samców. Ponadto, u potomstwa obu płci wykazano wpływ MIA na wzrost szerokości główki kolców dendrytycznych. Może to sugerować zmianę kształtu kolców w kierunku formy bardziej dojrzałej, tworzącej silniejsze połączenia synaptyczne (Hayashi i Majewska, 2005; Yoshihara i in., 2009). Wydaje się, że wzrost szerokości główki mógłby być mechanizmem kompensacyjnym związanym ze spadkiem gęstości kolców dendrytycznych, jednak nie tłumaczy to zmian zaobserwowanych u samców.

Wpływ MIA na gęstość kolców dendrytycznych neuronów piramidowych hipokampa był do tej pory przedmiotem kilku badań, głównie dotyczących samców. Aktywacja układu odpornościowego matki, zarówno w modelu infekcji wirusowej jak i bakteryjnej, zazwyczaj nie wpływała na gęstość kolców dendrytycznych neuronów piramidowych hipokampa u samców (Baharnoori i in., 2009; Fernández de Cossío i in., 2017; Tan i in., 2022) z wyjątkiem jednego badania, w którym iniekcja z poly(I:C) na wczesnym etapie ciąży (E9) spowodowała spadek gęstości wypustek dendrytycznych (Abazyan i in., 2010). Analiza ta dotyczyła jednak dendrytów bazalnych, a nie apikalnych, które badano w tej rozprawie. Z kolei dane literaturowe dotyczące wpływu MIA na gęstość kolców u samic ograniczają się do jednego doniesienia (Fernández de Cossío i in., 2017), w którym nie wykazano zmian po iniekcji LPS w 15. dniu ciąży. Badanie to przeprowadzono jednak na młodszych zwierzętach (P15), z wykorzystaniem innych metod barwienia (Golgi) oraz nie sprecyzowano lokalizacji analizowanych komórek piramidowych w obrębie struktury hipokampa. Co ciekawe, spadek gęstości kolców dendrytycznych często raportowano u pacjentów ze schizofrenią, a zmiany te obserwowano m.in. w różnych obszarach kory, a także w hipokampie (Garey i in., 1998; Kolomeets i in., 2005; Konopaske i in., 2014; Rosoklija i in., 2000).

Z kolei zmiany kształtu kolców dendrytycznych w modelach MIA analizowano tylko w dwóch badaniach przeprowadzonych na samcach (Baharnoori i in., 2009; Ikezu i in., 2020). U dorosłych myszy podanych MIA (poly(I:C), E9.5) zaobserwowano wzrost liczby kolców filopodialnych w komórkach piramidowych piątej warstwy mPFC (Ikezu i in., 2020). Z kolei Baharnori i wsp. u samców na wczesnym etapie rozwoju postnatalnego (P10) odnotowali spadek długości, ale także powierzchni kolców dendrytycznych, będący efektem podania LPS w 15. i 16. dniu ciąży (Baharnoori i in., 2009). Należy, jednak zauważyć, że wpływ MIA na gęstość jak i kształt kolców dendrytycznych jest bardzo

zależny od zastosowanego modelu, wieku i płci zwierząt, a także struktury czy typu neuronu, dlatego niezwykle istotne jest systematyczne i precyzyjne raportowanie zastosowanych procedur.

W niniejszej rozprawie wykazano, że także wyciszenie genu *Lcn2* u myszy kontrolnych powoduje zmiany gęstości i kształtu kolców dendrytycznych neuronów piramidowych CA1 hipokampa, a efekty te zaobserwowano jedynie u samców. Neurony samców KO z grupy kontrolnej charakteryzował niewielki wzrost gęstości oraz wydłużenie kolców dendrytycznych w stosunku do osobników dzikich. Zwiększoną gęstość kolców dendrytycznych u myszy *Lcn2* KO raportowano już wcześniej, zarówno w komórkach piramidowych CA1 i CA3, jak i w neuronach pobudzających BLA (Mucha i in., 2011; Skrzypiec i in., 2013). W badaniach tych brak *Lcn2* nie wpłynął jednak na kształt kolców dendrytycznych. Z kolei w innej pracy u zwierząt pozbawionych białka *Lcn2* nie wskazano zmian gęstości kolców w CA1, ale stwierdzono spadek liczby kolców grzybkowatych, a wzrost długich (Ferreira i in., 2013), co jest spójne ze wzrostem długości kolców obserwowanym w niniejszej pracy. Co ciekawe, zwiększoną gęstość oraz długie i cienkie kształt kolców dendrytycznych wykazano także u myszy transgenicznym z delecją genu *Fmr1*, będących modelem FXS (Cruz-Martín i in., 2010; Nimchinsky i in., 2001). Analogiczne zmiany obserwuje się u pacjentów z NDDs, głównie ASD i FXS, w różnych strukturach mózgu (Hutsler i Zhang, 2010; Irwin i in., 2001).

Warto także odnotować, że brak *Lcn2* u myszy poddanych aktywacji układu odpornościowego matki w rozwoju prenatalnym również przyczynił się do modyfikacji gęstości i kształtu kolców dendrytycznych w hipokampie zwierząt dorosłych. Zarówno u samic jak i samców delecja *Lcn2* u myszy po MIA spowodowała wzrost gęstości kolców i szerokości główki. Wydaje się jednak, że zmiany te nie były związane z MIA, ale wynikały z samej delecji *Lcn2*, gdyż nie wykazano żadnych różnic między myszami KO ctrl i KO MIA.

Zarówno badania na myszach z delecją *Lcn2*, jak i dane z eksperymentów *in vitro* podkreślają rolę tego białka w regulacji morfologii kolców dendrytycznych oraz plastyczności synaptycznej. Inkubacja pierwotnych hodowli neuronów hipokampa z rekombinowanym białkiem *Lcn2* powodowała zwężenie i wydłużenie kolców dendrytycznych, czyli zmianę w kierunku formy bardziej niedojrzałej (Doliwa i in., 2024). Ponadto, pokazano że egzogenna *Lcn2* obniża poziom receptorów NMDA na powierzchni

komórek, redukuje poziom białka postsynaptycznego PSD-95 oraz powoduje zmniejszenie LTP (Kim i in., 2024).

Należy zauważyć, że zastosowana w niniejszej pracy metoda obrazowania kolców dendrytycznych wiąże się z pewnymi ograniczeniami. Kolce dendrytyczne to struktury trójwymiarowe; określenie ich kształtu na podstawie dwuwymiarowych obrazów dendrytów może być więc mniej precyzyjne, w porównaniu z analizami morfologii przeprowadzanymi na podstawie rekonstrukcji 3D (Basu i in., 2018). Ponadto, nie wszystkie kolce dendrytyczne tworzą funkcjonalne synapsy (Berry i Nedivi, 2017). Aby zweryfikować, czy obserwowane zmiany gęstości dotyczą kolców dendrytycznych zawierających funkcjonalne synapsy można byłoby przeprowadzić dodatkowe barwienia immunofluorescencyjne z wykorzystaniem białek markerowych dla części pre- i postsynaptycznej synaps (np. białko Bassoon i PSD-95). Innym podejściem byłoby przeprowadzenie eksperymentów elektrofizjologicznych, np. rejestracji mEPSCs, pozwalających na ocenę zmian funkcjonowania synaps, które obserwowano już w modelach MIA (Coiro i in., 2015; Ito i in., 2010; Zhang i van Praag, 2015).

5.6. MIA i delecja genu *Lcn2* powodują wystąpienie deficytów behawioralnych przypominających objawy zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa, jednak brak *Lcn2* w modelu infekcji prenatalnej nie wpływa na zachowanie zwierząt

5.6.1. Zachowania społeczne

W niniejszej pracy do oceny zachowań społecznych myszy zastosowano system Eco-HAB, będący w pełni zautomatyzowanym narzędziem umożliwiającym monitorowanie interakcji społecznych grupy zwierząt, który, jak już wcześniej wykazano, jest wyjątkowo użyteczny do badania deficytów społecznych u gryzoni (Puścian i in., 2016, 2022; Roszkowska i in., 2022; Szewczyk i in., 2024). Otrzymane wyniki wykazały, że zastosowanie modelu infekcji prenatalnej powoduje zaburzenia interakcji społecznych. Zarówno samce jak i samice o genotypie niezmienionym, których matki otrzymywały iniekcje LPS, były mniej skłonne do spędzania czasu z innymi osobnikami w porównaniu do myszy kontrolnych. Co ciekawe, sama delecja genu *Lcn2* u myszy kontrolnych obu płci wywołała analogiczny efekt. Ponadto u samic także towarzyskość myszy KO MIA była obniżona w stosunku do myszy WT MIA, jednak nie różniła się od myszy KO z grupy kontrolnej.

Sugeruje to, że w grupie samic delecja *Lcn2* spowodowała silniejsze zaburzenia interakcji społecznych w porównaniu do iniekcji LPS.

Innym wskaźnikiem zaburzeń społecznych myszy jest również obniżone zainteresowanie bodźcami społecznymi, które można oceniać zarówno w teście Eco-HAB, jak i w bardziej klasycznym i powszechnie stosowanym teście trójkomorowym. W typowej odmianie testu trójkomorowego bodziec społeczny stanowi nieznana mysz. W niniejszej pracy, w celu ujednolicenia prezentowanych bodźców w obu testach zastosowano ten sam bodziec społeczny, tj. ściółkę pochodzącą od nieznanymi myszy. Podobną modyfikację testu trójkomorowego zastosowano już wcześniej (Szewczyk i in., 2024), a uzyskane wyniki były zbliżone do standardowej odmiany testu. Zarówno w systemie Eco-HAB jak i teście trójkomorowym zaobserwowano różnice płciowe w reakcji na bodziec społeczny. Aktywacja układu odpornościowego matki wpłynęła na zmniejszenie zainteresowania zapachem nieznanymi myszy jedynie w przypadku samic o genotypie dzikim. U samców efekt ten nie był obecny, jednak zaobserwowano obniżenie wskaźnika preferencji zapachu społecznego spowodowane delecją genu *Lcn2*. Należy także zauważyć, że w teście trójkomorowym pojawił się efekt nieobserwowany w przypadku doświadczenia w klatce Eco-HAB., tj. indukowane LPS obniżenie zainteresowania bodźcem społecznym także u myszy z delecją genu *Lcn2*. Różnice te mogą wynikać z odmiennego przebiegu obu doświadczeń. W przeciwieństwie do badania w klatce Eco-HAB, w której zwierzęta przebywają w grupie, podczas testu trójkomorowego myszy testowane są pojedynczo. Co więcej, faza testowa testu trójkomorowego trwa jedynie 10 min, jest więc znacznie krótsza niż badanie preferencji zapachu społecznego w klatce Eco-HAB.

Problemy z nawiązywaniem i podtrzymywaniem kontaktów społecznych stanowią kluczowy aspekt zaburzeń u osób z ASD i są także charakterystyczne dla innych zaburzeń neurorozwojowych (Korkmaz, 2011; Volkmar, 2011). Zaburzenia zachowań społecznych są też jednym z najbardziej powtarzalnych fenotypów obserwowanych w modelach MIA (Kentner i in., 2019), co zostało potwierdzone również w tej pracy. Po raz pierwszy wykazano jednak, że myszy pozbawione *Lcn2* charakteryzują się analogicznymi do potomstwa MIA dysfunkcjami interakcji społecznych.

5.6.2. Zachowania powtarzalne

W celu oceny wpływu MIA i delekcji genu *Lcn2* na wystąpienie zachowań powtarzalnych u gryzoni zastosowano test zakopywania kulek. Rezultaty tych doświadczeń wykazały, że efekt MIA był zależny od płci i genotypu zwierząt - iniekcje LPS w okresie prenatalnym skutkowały zwiększeniem liczby zakopanych kulek jedynie u samców o genotypie dzikim. Zakopywanie kulek bywa interpretowane jako strategia obronna gryzoni wynikająca z lęku lub niepokoju, gdyż myszy często zakopują obiekty w swoim otoczeniu w odpowiedzi na bodźce awersyjne (tzw. *defensive burying*) (Thomas i in., 2009). Inne badania wskazują jednak, że zakopywanie kulek wynika raczej z samego kopania, będącego naturalnym zachowaniem gryzoni wywoływanym przez obecność ściółki. Zachowanie to nie ulega habituacji i jest traktowane jako forma aktywności stereotypowej - powtarzającej się, w której gryzonie angażują się w jedno, skoordynowane zadanie przez dłuższy czas. Nadmierne kopanie, w wyniku którego myszy zakopują większą ilość szklanych kulek jest przez wielu badaczy interpretowane jako zachowania powtarzalne lub kompulsywne, które są charakterystyczne dla zaburzeń obsesyjno-kompulsyjnych lub zaburzeń ze spektrum autyzmu (Angoa-Pérez i in., 2013; Dixit i in., 2020; Thomas i in., 2009). Co istotne, w licznych pracach z wykorzystaniem modeli MIA wykazywano wzrost liczby zakopanych kulek u myszy zarówno w modelu infekcji wirusowej jak i bakteryjnej (Choi i in., 2016; Coiro i in., 2015; Fernández de Cossío i in., 2017; Kirsten i Bernardi, 2017; Malkova i in., 2012; Pendyala i in., 2017; Wu i in., 2015).

Co ciekawe, podobnie jak w przypadku zachowań społecznych sama delekcja genu *Lcn2* u myszy kontrolnych indukowała zbliżony do obserwowanego u potomstwa MIA fenotyp. Zarówno samce i samice KO z grupy kontrolnej zakopały więcej kulek w porównaniu do myszy WT. Z kolei u myszy po infekcji brak białka *Lcn2* nie wpłynął na zachowanie zwierząt. Do tej pory nie badano wpływu delekcji genu *Lcn2* na występowanie zachowań powtarzalnych, wiadomo jednak, że białko to bierze udział w zachowaniach lękowych, które zostaną opisane w następnym podrozdziale.

5.6.3. Zachowania lękowe

W niniejszej dysertacji w celu oceny występowania zaburzeń lękowych u myszy zastosowano test podwyższonego labiryntu krzyżowego, w którym po raz kolejny wykazano specyficzny dla płci efekt MIA. Samce o genotypie dzikim, których matki w ciąży

otrzymywały iniekcje LPS charakteryzowały się podwyższonym poziomem lęku, obserwowanym jako zwiększenie ilości wejść oraz czasu przebywania w ramionach otwartych labiryntu w porównaniu do osobników z grupy kontrolnej. Z kolei samice o genotypie prawidłowym poddane MIA nie różniły się od samic kontrolnych we wspomnianych parametrach. Myszy te wykazywały jednak tendencję w kierunku obniżenia ilości niechronionych wychyleń pyszczka co również może świadczyć o podwyższeniu poziomu lęku u tych zwierząt, aczkolwiek mniej wyraźne niż w przypadku samców. Otrzymane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi, które wskazują na nasilenie zachowań lękowych u potomstwa MIA (Quagliato i in., 2021). Co istotne, mimo, że zaburzenia lękowe nie są typowym objawem zaburzeń neurorozwojowych to często współwystępują z różnymi NDDs (England-Mason, 2020; Kirsch i in., 2020; Quenneville i in., 2022).

W niniejszej pracy nie wykazano wpływu delecji genu *Lcn2* na lękowość zwierząt z w teście EPM. Wyniki te są spójne z badaniem z 2011 r., w którym Mucha i wsp. również nie zaobserwowali zwiększenia zachowań lękowych mierzonych w teście EPM oraz w teście jasnego i ciemnego pola (ang. *light-dark box test*) u myszy *Lcn2* KO (Mucha i in., 2011). Tymczasem wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez zespół Ferreiry i wsp. wykazały nasilenie zachowań lękowych u myszy pozbawionych białka *Lcn2*, czemu towarzyszył podwyższony poziom kortykosteronu w surowicy krwi tych zwierząt (Ferreira i in., 2013, 2023; Ferreira i Marques, 2023). Mimo, że w niniejszej pracy nie stwierdzono wpływu delecji genu *Lcn2* na zachowanie myszy z grupy kontrolnej w teście EMP to u zwierząt tych - zarówno samców jak i samic - zaobserwowano obniżoną aktywność w pierwszej godzinie trwania doświadczenia w klatce Eco-HAB. Zmniejszenie zachowań eksploracyjnych w nowym środowisku może być interpretowane jako zachowanie związane z lękiem (Bailey i Crawley, 2011). To, że efekt ten został zaobserwowany w systemie Eco-HAB, a nie w teście EPM może wynikać z różnic w przebiegu obu testów. Warunki przeprowadzania testu EMP (np. bezpośredni kontakt z eksperymentatorem) są bardziej stresujące dla zwierząt, co może wpływać na mniejszą czułość testu, w porównaniu do doświadczenia w klatce Eco-HAB, w którym myszy są testowane w grupie, bez udziału eksperymentatora. Należy również zauważyć, że nie tylko brak białka *Lcn2*, ale także jego podwyższony poziom są związane z występowaniem zachowań lękowych. Yan i wsp. (2024) w niedawno

opublikowanym badaniu, zaproponowali, że Lcn2 wydzielana z wątroby do krwi pod wpływem przewlekłego stresu wpływa na wystąpienie indukowanych stresem zachowań lękowych (Yan i in., 2024). Ponadto wykazano podwyższone stężenie białka Lcn2 w surowicy, hipokampie i ciele migdałowatym myszy w modelu stresu unieruchomienia (Mucha i in., 2011; Skrzypiec i in., 2013), a także w osoczu pacjentów wykazujących objawy lękowe (Yan i in., 2024). Świadczy to o złożonej regulacji zachowań przez Lcn2, gdzie zarówno nadmiar tego białka, jak i jego brak wpływają na wystąpienie zachowań związanych z lękiem.

5.6.4. Zaburzenia kognitywne

Do oceny obecności deficytów poznawczych u badanych grup myszy wykorzystano model uczenia się motywowanego apetytywnie. Doświadczenie przeprowadzono w zautomatyzowanej klatce IntelliCage, która umożliwia na testowanie zwierząt w grupie i, jak już wykazano wcześniej, stanowi przydatne narzędzie do oceny zaburzeń procesów uczenia się (Kiryk i in., 2020; Knapska i in., 2006, 2013). W trakcie doświadczenia zwierzęta uczyły się rozróżniania lokalizacji dwóch butelek znajdujących się w jednym z rogów klatki, z których jedna zawiera wodę, a druga roztwór sacharozy w wodzie, będący dla gryzoni bodźcem apetytywnym (Bachmanov i in., 1996; Bobadilla i in., 2020). Wyniki opisanych w niniejszej pracy badań sugerują, że zastosowany model infekcji w ciąży nie wpłynął na zdolność uczenia się motywowanego apetytywnie u potomstwa MIA. Wcześniejsze doniesienia pokazywały zarówno upośledzenie uczenia się u potomstwa MIA (Baharnoori i in., 2009; Batinić i in., 2016; Giovanoli i in., 2015), jak i brak lub niewielki wpływ prenatalnej indukcji układu odpornościowego matki na procesy uczenia się gryzoni (Abazyan i in., 2010; Han i in., 2011). Wydaje się, że obserwowany u potomstwa MIA efekt zależy od zastosowanego w badaniu modelu MIA, ale także użytego testu i rodzaju pamięci, który oceniano (Golan i in., 2005; Han i in., 2011; Munarriz-Cuezva i Meana, 2024). Na przykład niektóre badania wykazały, że MIA nie wpłynęła na sam proces uczenia się motywowanego apetytywnie, a jedynie na fazę przeuczania się (ang. *reversal learning*) co może sugerować deficyty elastyczności poznawczej u tych zwierząt (Kleinmans i Bilkey, 2018; Munarriz-Cuezva i Meana, 2024).

Nie zaobserwowano także wpływu delecji genu *Lcn2* na proces uczenia się motywowanego apetytywnie. Tymczasem inni badacze wykazali łagodne deficyty uczenia

się przestrzennego w labiryncie wodnym Morrisa u myszy *Lcn2* KO (Ferreira i in., 2013, 2023). Mimo, że zwierzęta te uczyły się położenia ukrytej pod wodą platformy i skracaly czas do jej znalezienia w ciągu kolejnych dni sesji treningowych, to drugiego dnia eksperymentu wykazywały wydłużony czas znalezienia platformy w porównaniu z myszami o genotypie prawidłowym. Warto jednak zauważyć, że w labiryncie wodnym Morrisa motywacja opiera się na chęci uniknięcia dyskomfortu związanego z przebywaniem w wodzie, jest to więc model uczenia się motywowanego awersyjnie. Może to sugerować, że brak *Lcn2* ma znaczenie jedynie w przypadku pamięci związanej z bodźcami negatywnymi. Należy także pamiętać, że w niniejszej pracy myszy z delecją genu *Lcn2* z grupy kontrolnej były narażone na stres iniekcji w okresie prenatalnym, co mogło wpłynąć na rozwój ich mózgu. Może to powodować odchylenia fenotypowe w porównaniu z naiwnymi myszami *Lcn2* KO wykorzystywanymi w innych badaniach.

Wydaje się, że na zaburzenia poznawcze ma wpływ szczególnie *Lcn2* wydzielana pod wpływem stanu zapalnego w dorosłym mózgu. Deficyty poznawcze wywołane przez podanie myszom wysokiej dawki LPS (5 mg/kg) oceniane w teście rozpoznawania nowego obiektu (ang. *novel object recognition test*) były osłabione u myszy z delecją *Lcn2* (Jang i in., 2013). Co więcej, wykazano, że *Lcn2* pochodząca z reaktywnych astrocytów, która pośredniczyła w rozwoju stanu zapalnego, również związana była z upośledzeniem funkcji poznawczych (Kim i in., 2024). Badania te sugerują, że funkcje *Lcn2* w warunkach fizjologicznych mogą być odmienne od jej funkcji związanych ze zwiększonym wydzielaniem tego białka podczas stanu zapalnego. Co istotne, podwyższone stężenie *Lcn2* we krwi obserwuje się u pacjentów z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (Choi i in., 2011), a także u pacjentów z uszkodzeniem rdzenia kręgowego, u których poziom *Lcn2* był negatywnie skorelowany z funkcjami poznawczymi (Zhang i in., 2023).

5.7. Prawdopodobne przyczyny deficytów obserwowanych u zwierząt z delecją genu *Lcn2*

W niniejszej pracy starano się zweryfikować czy białko *Lcn2* bierze udział w mechanizmach leżących u podstaw zaburzeń rozwoju mózgu spowodowanych aktywacją układu odpornościowego matki w rozwoju prenatalnym. Co istotne, wykazano jednak, że sama delecja genu *Lcn2* u myszy kontrolnych skutkuje wystąpieniem deficytów behawioralnych,

takich jak zaburzenia zachowań społecznych i zachowania powtarzalne. Ponadto u myszy KO stwierdzono zwiększenie gęstości oraz wydłużenie kolców dendrytycznych. Warto zauważyć, że oba te fenotypy są charakterystyczne dla pacjentów z ASD. W niniejszej pracy wykazano także, że ekspresja *Lcn2* jest regulowana w mózgu podczas rozwoju – zaczyna się już prenatalnie, osiąga szczyt w dniu narodzin i utrzymuje się przez cały proces dojrzewania aż do dorosłości. Uzyskane wyniki sugerują, że *Lcn2* może pełnić ważne funkcje już na wczesnych etapach rozwoju mózgu.

Warto zauważyć, że także receptory dla *Lcn2* ulegają ekspresji w trakcie rozwoju. Ekspresję NGALR w ludzkim neuronabłonku wykazano już w 4. tygodniu ciąży, a jego obecność utrzymywała się poprzez późniejsze etapy ciąży, a także w rozwoju postnatalnym do dorosłości (Zhang i in., 2012). Receptor LRP2 również ulega ekspresji w rozwoju prenatalnym – jego obecność wykazano w neuronabłonku gryzoni około E9-11. Wykazano także, że receptor ten odgrywa ważną rolę podczas embriogenezy, dostarczając płodowi składników odżywczych i kontrolując sygnalizację SHH (ang. *Sonic hedgehog protein*), niezbędną do różnicowania się cewy nerwowej, a myszy pozbawione LRP2 charakteryzują się defektami rozwojowymi, takimi jak zmniejszenie objętości kresomózgowia czy holoprozencefalia (jednokomorowe przodomózgowie) (Fisher i Howie, 2006). Z kolei receptor MC4R ulega ekspresji w szczurzym mózgu w E14 a do E19 wzór jego ekspresji jest podobny do tego obserwowanego w dorosłym mózgu (Catania, 2011).

Istnieje kilka potencjalnych mechanizmów w jakich *Lcn2* może wpływać na rozwój mózgu. Przede wszystkim wykazano, że w narządach obwodowych *Lcn2* jest zaangażowana w pierwsze etapy rozwoju i różnicowania się komórek, np. w procesie morfogenezy nabłonka nerek czy różnicowania komórek progenitorowych krwi oraz kości (Jiang i in., 2023; Miharada i in., 2005; Yang i in., 2002). Ponadto zaobserwowano, że warunkach *in vitro* *Lcn2* reguluje migrację neuronów, astrocytów i mikrogleju oraz wpływa na sensytyzację tych komórek na sygnały pro-apoptotyczne (Lee i in., 2011). Zarówno migracja, jak i apoptoza to kluczowe procesy w rozwoju mózgu, które zachodzą już na wczesnych etapach życia prenatalnego. Wpływ *Lcn2* na rozwój mózgu mógłby być także związany z regulacją homeostazy żelaza. Wykazano bowiem, że pierwiastek ten jest niezbędny do prawidłowego rozwoju układu nerwowego, wpływając na podziały

komórek, syntezę neuroprzekaźników a także mielinizację (Lozoff i Georgieff, 2006). Warto zauważyć, że deficyty żelaza w trakcie rozwoju wpływały na rozwój drzewa dendrytycznego neuronów piramidowych CA1 w hipokampie szczurów (Brunette i in., 2010). Zaburzenia struktury drzewa dendrytycznego obserwowane są także u myszy *Lcn2* KO (Ferreira i in., 2013).

Co ciekawe, u myszy z delecją genu *Lcn2* zaobserwowano także zaburzenia mikroflory jelitowej (Klüber i in., 2021). Obecnie rośnie ilość dowodów wskazujących na znaczenie osi jelito-mózg dla prawidłowego funkcjonowania mózgu (Morais i in., 2021). Najnowsze badania wskazują, że mikrobiota jelitowa może odgrywać rolę także w rozwoju mózgu, wpływając na kształtowanie się sieci neuronowych kluczowych dla rozwoju zachowań emocjonalnych i społecznych, a jej nieprawidłowości mogą potencjalnie przyczyniać się do rozwoju zaburzeń neurorozwojowych (Kelly i in., 2017).

W niniejszej pracy wykazano także, że mimo, iż ekspresja *Lcn2* rośnie w mózgu płodów 4 i 24 godziny po ostatniej iniekcji LPS, to delecja *Lcn2* nie wpływa znacząco na zachowanie zwierząt narażonych na aktywację układu odpornościowego matki - u potomstwa MIA pozbawionego *Lcn2* obserwowano podobne deficyty behawioralne, jak u zwierząt poddanych MIA o genotypie niezmiennym. Nie wykazano także istotnych różnic między zachowaniem myszy z wyciszeniem genu *Lcn2* z grupy kontrolnej, a myszy KO narażonych na iniekcje LPS. Brak efektu delecji *Lcn2* u myszy narażonych na MIA może więc wynikać z faktu, iż sama nieobecność białka *Lcn2* podczas rozwoju prowadzi do deficytów zbliżonych do tych obserwowanych u potomstwa MIA o genotypie prawidłowym. Podobieństwo fenotypów behawioralnych obserwowanych u myszy z grup WT MIA i KO ctrl oraz brak efektu addytywnego u zwierząt z grupy KO MIA może sugerować, że delecja *Lcn2* mogłaby zakłócać podobne procesy lub szlaki neuronalne co aktywacja układu odpornościowego matki. Co ciekawe, analogiczne wyniki uzyskano stosując model infekcji wirusowej u myszy transgeniczných z delecją genu *Fmr1* (Hilal i in., 2024).

Warto zauważyć, że także iniekcje LPS na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego gryzoni były związane z wystąpieniem zaburzeń zachowań społecznych i zachowań powtarzalnych (Carlezon i in., 2019). Biorąc pod uwagę, że pod koniec pierwszego tygodnia rozwoju postnatalnego gryzoni rozpoczyna się proces intensywnej synaptogenezy oraz rozwoju i dojrzewania kolców dendrytycznych (Fiala i in., 1998; Li i in.,

2010; Petit i in., 1988) oraz uwzględniając rolę *Lcn2* w regulacji morfologii kolców dendrytycznych, odmienne rezultaty mogłyby przynieść doświadczenia z udziałem myszy pozbawionych *Lcn2* w modelu infekcji postnatalnej.

5.8. Efekty aktywacji układu odpornościowego matki i delekcji genu *Lcn2* są determinowane przez płeć potomstwa

Wpływ MIA na wystąpienie zachowań przypominających objawy zaburzeń neurorozwojowych oraz na morfologię i właściwości elektrofizjologiczne neuronów hipokampa był wyraźnie zależny od płci. W przypadku samic iniekcje LPS w okresie prenatalnym wpływały jedynie na zachowania społeczne myszy; zwierzęta te wykazywały także tendencję w kierunku nasilenia zachowań związanych z lękiem. U samców oprócz deficytów społecznych, aktywacja układu odpornościowego matki skutkowała wyraźnym zwiększeniem poziomu lęku a także wystąpieniem zachowań powtarzalnych, czemu towarzyszyły deficyty podstawowych właściwości elektrofizjologicznych neuronów hipokampa. Różnice płciowe były również widoczne w ekspresji mRNA cytokin prozapalnych – indukowana LPS odpowiedź zapalna była silniejsza w łożyskach pochodzących od samców niż u samic, a jedynie u samców wykazano indukowany MIA wzrost ekspresji cytokin prozapalnych w mózgu płodów. Wnioski z doświadczeń wykorzystujących modele MIA także wskazują na odmienny wpływ MIA na zachowanie i budowę i funkcję mózgu u potomstwa płci męskiej i żeńskiej (przegląd można znaleźć w artykułach Ardalan i in., 2019; Breach i Lenz, 2023).

Co ciekawe, również delekcja genu *Lcn2* wywoływała odmienne skutki u samców i samic. Podczas gdy u samic stwierdzono zmniejszenie towarzyskości i wzrost zachowań powtarzalnych, u samców deficyty społeczne były pogłębione, a dodatkowo towarzyszył im wzrost gęstości i długości kolców dendrytycznych neuronów hipokampa oraz wzrost pobudliwości tych komórek. Wyniki przedstawione w tej pracy sugerują, że profil ekspresji *Lcn2* w mózgu płodu pod wpływem stanu zapalnego wywołanego podaniem LPS matce także różni się u obu płci. Mimo, że zarówno u samic i samców zaobserwowano podobny wzrost ekspresji *Lcn2* w mózgu 24h po ostatniej iniekcji z LPS, to 4h po iniekcji wzrost obserwowano jedynie u samców. Niestety badania funkcji jakie pełni *Lcn2* w mózgu przeprowadzano do tej pory niemal wyłącznie na samcach.

Co istotne, częstotliwość występowania NDDs jest także większa u mężczyzn, jednak przyczyny tego zjawiska nie są znane (Pinares-Garcia i in., 2018; Polyak i in., 2015). Ponadto brakuje badań epidemiologicznych, które uwzględniają płeć jako czynnik różnicujący wpływ infekcji na rozwój zaburzeń neurorozwojowych (D’Mello, 2022).

Różnice płciowe w zaburzeniach neurorozwojowych wynikają prawdopodobnie z kompleksowej interakcji między czynnikami genetycznymi, hormonalnymi, immunologicznymi i środowiskowymi. Co istotne, przebieg rozwoju mózgu jest nieco inny u kobiet i mężczyzn – oprócz odmiennej ekspozycji na hormony płciowe, która moduluje procesy zachodzące podczas rozwoju, istnieją także różnice dotyczące liczby i morfologii komórek glejowych na kolejnych etapach rozwoju postnatalnego, co może mieć niebagatelne znaczenie dla modulowania efektów wywołanych przez infekcję prenatalną (Ardalan i in., 2019).

Innym mechanizmem, za pomocą którego płeć potomstwa może oddziaływać z MIA, mogą być receptory estradiolu ($ER\alpha$ i $ER\beta$). Estradiol reguluje aktywację szlaków sygnalizacji immunologicznej i może wpływać na syntezę cytokin pro- i przeciwzapalnych poprzez szlak NF- κ B (Kovats, 2015; Liu i in., 2017, 2020). Ekspresja i aktywacja ER różni się u mężczyzn i kobiet, co powoduje różnice w wielkości i czasie trwania wrodzonej odpowiedzi zapalnej między płciami (Arnold i Saijo, 2021; Kovats, 2015). Co ciekawe, wykazano, że także ekspresja Lcn2 jest regulowana przez estradiol (Liu i in., 2020).

6. Podsumowanie i wnioski

W niniejszej dysertacji wykazano, że aktywacja układu odpornościowego matki powoduje wystąpienie deficytów behawioralnych przypominających objawy zaburzeń neurorozwojowych u potomstwa myszy, czemu towarzyszą zmiany strukturalne i funkcjonalne komórek nerwowych. Co ważne, sama delecja genu *Lcn2* w podobny sposób wpływała na zachowanie gryzoni. Brak *Lcn2* u potomstwa poddanego MIA nie wpłynął jednak w znacznym stopniu na fenotyp tych zwierząt. Uzyskane wyniki nie pozwalają jednoznacznie określić roli *Lcn2* w rozwoju zaburzeń wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki, jednak wskazują, że białko to pełni istotne funkcje podczas prawidłowego rozwoju mózgu.

W szczególności w ramach niniejszej pracy wykazano, że:

1. Ekspresja mRNA *Lcn2* jest regulowana w rozwijającym się mózgu myszy.
2. Aktywacja układu odpornościowego matki indukuje ekspresję *Lcn2* w mózgu płodów obu płci.
3. MIA powoduje wzrost ekspresji cytokin prozapalnych w łożysku i mózgu płodów, a delecja genu *Lcn2* wpływa na osłabienie odpowiedzi zapalnej w mózgu.
4. U myszy o genotypie prawidłowym MIA prowadzi do obniżenia pobudliwości neuronów piramidowych hipokampa samców, ale nie samic. Ponadto MIA powoduje spadek gęstości kolców dendrytycznych u samic oraz wzrost szerokości główki kolców u potomstwa obu płci. Zwierzęta te wykazują również zaburzenia zachowań społecznych oraz zachowania powtarzalne i lękowe, przy czym deficyty te są bardziej nasilone u samców.
5. Delecja genu *Lcn2* u myszy z grupy kontrolnej wpływa na wzrost pobudliwości oraz wydłużenie i wzrost gęstości kolców dendrytycznych neuronów pola CA1 hipokampa, a efekt ten jest obecny jedynie u samców. Dodatkowo myszy KO z grupy kontrolnej wykazują zaburzenia zachowań społecznych oraz zachowania powtarzalne i związane z lękiem, przy czym u samców fenotyp ten jest bardziej nasilony.
6. Aktywacja układu odpornościowego matki w połączeniu z delecją genu *Lcn2* nie prowadzi do nasilenia zaburzeń zachowania zwierząt.

7. Bibliografia

1. Abazyan, B., Nomura, J., Kannan, G., Ishizuka, K., Tamashiro, K. L. K., Nucifora, F., Pogorelov, V., Ladenheim, B., Yang, C., Krasnova, I. N., Cadet, J. L., Pardo, C., Mori, S., Kamiya, A., Vogel, M., Sawa, A., Ross, C. A., i Pletnikov, M. V. (2010). Prenatal interaction of mutant DISC1 and immune activation produces adult psychopathology. *Biological Psychiatry*, 68(12), 1172–1181. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.09.022>
2. Aderem, A., i Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406(6797), 782–787. <https://doi.org/10.1038/35021228>
3. Adler, O., Zait, Y., Cohen, N., Blazquez, R., Doron, H., Monteran, L., Scharff, Y., Shami, T., Mundhe, D., Glehr, G., Kanner, A. A., Horn, S., Yahalom, V., Haferkamp, S., Hutchinson, J. A., Bleckmann, A., Nahary, L., Benhar, I., Yust Katz, S., ... Erez, N. (2023). Reciprocal interactions between innate immune cells and astrocytes facilitate neuroinflammation and brain metastasis via lipocalin-2. *Nature Cancer*, 4(3), 401–418. <https://doi.org/10.1038/s43018-023-00519-w>
4. Akarsu, E. S., i Mamuk, S. (2007). Escherichia coli lipopolysaccharides produce serotype-specific hypothermic response in biotelemetered rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292(5), R1846–1850. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00786.2006>
5. AL-Ayadhi, L. Y., i Mostafa, G. A. (2012). Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 158. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-158>
6. Allen, N. J., Bennett, M. L., Foo, L. C., Wang, G. X., Chakraborty, C., Smith, S. J., i Barres, B. A. (2012). Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature*, 486(7403), 410–414. <https://doi.org/10.1038/nature11059>
7. Ambjørn, M., Asmussen, J. W., Lindstam, M., Gotfryd, K., Jacobsen, C., Kiselyov, V. V., Moestrup, S. K., Penkowa, M., Bock, E., i Berezin, V. (2008). Metallothionein and a peptide modeled after metallothionein, EmtinB, induce neuronal differentiation and survival through binding to receptors of the low-density lipoprotein receptor family. *Journal of Neurochemistry*, 104(1), 21–37. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05036.x>
8. Amodeo, D. A., Lai, C.-Y., Hassan, O., Mukamel, E. A., Behrens, M. M., i Powell, S. B. (2019). Maternal immune activation impairs cognitive flexibility and alters transcription in frontal cortex. *Neurobiology of Disease*, 125, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.01.025>
9. Angoa-Pérez, M., Kane, M. J., Briggs, D. I., Francescutti, D. M., i Kuhn, D. M. (2013). Marble Burying and Nestlet Shredding as Tests of Repetitive, Compulsive-like Behaviors in Mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 82, 50978. <https://doi.org/10.3791/50978>
10. Anwaar, I., Gottsäter, A., Ohlsson, K., Mattiasson, I., i Lindgärde, F. (1998). Increasing levels of leukocyte-derived inflammatory mediators in plasma and cAMP in platelets during follow-up after acute cerebral ischemia. *Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)*, 8(6), 310–317. <https://doi.org/10.1159/000015873>

11. Araya, R., Vogels, T. P., i Yuste, R. (2014). Activity-dependent dendritic spine neck changes are correlated with synaptic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111(28), E2895–E2904. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321869111>
12. Ardalan, M., Chumak, T., Vexler, Z., i Mallard, C. (2019). Sex-Dependent Effects of Perinatal Inflammation on the Brain: Implication for Neuro-Psychiatric Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2270. <https://doi.org/10.3390/ijms20092270>
13. Arnold, M. L., i Saijo, K. (2021). Estrogen Receptor β as a Candidate Regulator of Sex Differences in the Maternal Immune Activation Model of ASD. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, 717411. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.717411>
14. Ashdown, H., Dumont, Y., Ng, M., Poole, S., Boksa, P., i Luheshi, G. N. (2006). The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: Implications for schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 11(1), 47–55. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001748>
15. Ashwood, P., Enstrom, A., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Croen, L. A., Ozonoff, S., Pessah, I., i Van de Water, J. (2008). Decreased Ttransforming Ggrowth Ffactor beta1 in autism: a potential link between immune dysregulation and impairment in clinical behavioral outcomes. *Journal of Nneuroimmunology*, 204(1–2), 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.07.006>
16. Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I. N., i Van de Water, J. (2011). Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *Journal of Neuroimmunology*, 232(1–2), 196–199. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.10.025>
17. Atladóttir, H. Ó., Henriksen, T. B., Schendel, D. E., i Parner, E. T. (2012). Autism after infection, febrile episodes, and antibiotic use during pregnancy: An exploratory study. *Pediatrics*, 130(6), e1447-1454. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-1107>
18. Ayubi, E., i Mansori, K. (2022). Maternal Infection during Pregnancy and Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iranian Journal of Public Health*, 51(12), 2674–2687. <https://doi.org/10.18502/ijph.v51i12.11458>
19. Babri, S., Doosti, M.-H., i Salari, A.-A. (2014). Strain-dependent effects of prenatal maternal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors in offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37, 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.003>
20. Bachmanov, A. A., Tordoff, M. G., i Beauchamp, G. K. (1996). Ethanol Consumption and Taste Preferences in C57BL/6ByJ and 129/J Mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 20(2), 201–206.
21. Baharnoori, M., Bhardwaj, S. K., i Srivastava, L. K. (2012). Neonatal Behavioral Changes in Rats With Gestational Exposure to Lipopolysaccharide: A Prenatal Infection Model for Developmental Neuropsychiatric Disorders. *Schizophrenia Bulletin*, 38(3), 444–456. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbq098>
22. Baharnoori, M., Brake, W. G., i Srivastava, L. K. (2009). Prenatal immune challenge induces developmental changes in the morphology of pyramidal neurons of the prefrontal cortex and hippocampus in rats. *Schizophrenia Research*, 107(1), 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2008.10.003>

23. Bailey, K. R., i Crawley, J. N. (2011). *Anxiety-Related Behaviors in Mice*.
24. Balslev, Y., Saunders, N. R., i Møllgård, K. (1996). Synaptogenesis in the neocortical anlage and early developing neocortex of rat embryos. *Acta Anatomica*, 156(1), 2–10. <https://doi.org/10.1159/000147822>
25. Banks, W. A., Kastin, A. J., i Broadwell, R. D. (1996). Passage of Cytokines across the Blood-Brain Barrier. *Neuroimmunomodulation*, 2(4), 241–248. <https://doi.org/10.1159/000097202>
26. Banks, W. A., Lynch, J. L., i Price, T. O. (2009). Cytokines and the Blood–Brain Barrier. W. A. Siegel i S. S. Zalcman (Red.), *The Neuroimmunological Basis of Behavior and Mental Disorders*, 3–17. https://doi.org/10.1007/978-0-387-84851-8_1
27. Bao, G., Clifton, M., Hoette, T. M., Mori, K., Deng, S.-X., Qiu, A., Viltard, M., Williams, D., Paragas, N., Leete, T., Kulkarni, R., Li, X., Lee, B., Kalandadze, A., Ratner, A. J., Pizarro, J. C., Schmidt-Ott, K. M., Landry, D. W., Raymond, K. N., ... Barasch, J. (2010). Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. *Nature Chemical Biology*, 6(8), 602–609. <https://doi.org/10.1038/nchembio.402>
28. Bao, G., Ho, C.-T., i Barasch, J. (2015). The Ligands of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *RSC Advances*, 5(126), 104363–104374. <https://doi.org/10.1039/C5RA18736B>
29. Basu, S., Saha, P. K., Roszkowska, M., Magnowska, M., Baczynska, E., Das, N., Plewczynski, D., i Wlodarczyk, J. (2018). Quantitative 3-D morphometric analysis of individual dendritic spines. *Scientific Reports*, 8(1), 3545. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21753-8>
30. Batinić, B., Santrač, A., Divović, B., Timić, T., Stanković, T., Obradović, A. L., Joksimović, S., i Savić, M. M. (2016). Lipopolysaccharide exposure during late embryogenesis results in diminished locomotor activity and amphetamine response in females and spatial cognition impairment in males in adult, but not adolescent rat offspring. *Behavioural Brain Research*, 299, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.11.025>
31. Bauman, M. D., Iosif, A.-M., Smith, S. E. P., Bregere, C., Amaral, D. G., i Patterson, P. H. (2014). Activation of the maternal immune system during pregnancy alters behavioral development of rhesus monkey offspring. *Biological Psychiatry*, 75(4), 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.06.025>
32. Behrens, V., Voelz, C., Müller, N., Zhao, W., Gasterich, N., Clarner, T., Beyer, C., i Zendedel, A. (2021). Lipocalin 2 as a Putative Modulator of Local Inflammatory Processes in the Spinal Cord and Component of Organ Cross talk After Spinal Cord Injury. *Molecular Neurobiology*, 58(11), 5907–5919. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02530-7>
33. Bennett, K. M., Liu, J., Hoelting, C., i Stoll, J. (2011). Expression and analysis of two novel rat organic cation transporter homologs, SLC22A17 and SLC22A23. *Molecular and cellular biochemistry*, 352(1–2), 143–154. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0748-y>
34. Bento-Abreu, A., Velasco, A., Polo-Hernández, E., Pérez-Reyes, P. L., Tabernero, A., i Medina, J. M. (2008). Megalin is a receptor for albumin in astrocytes and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *Journal of*

- Neurochemistry*, 106(3), 1149–1159. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05462.x>
35. Berard, J. L., Zarruk, J. G., Arbour, N., Prat, A., Yong, V. W., Jacques, F. H., Akira, S., i David, S. (2012). Lipocalin 2 is a novel immune mediator of experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis and is modulated in multiple sclerosis. *Glia*, 60(7), 1145–1159. <https://doi.org/10.1002/glia.22342>
 36. Berry, K. P., i Nedivi, E. (2017). Spine dynamics: Are they all the same? *Neuron*, 96(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.008>
 37. Bitanhirwe, B. K. Y., Peleg-Raibstein, D., Mouttet, F., Feldon, J., i Meyer, U. (2010). Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral and neurochemical abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 35(12), 2462–2478. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.129>
 38. Blanco-Suarez, E., Liu, T.-F., Kopelevich, A., i Allen, N. J. (2018). Astrocyte-Secreted Chordin-like 1 Drives Synapse Maturation and Limits Plasticity by Increasing Synaptic GluA2 AMPA Receptors. *Neuron*, 100(5), 1116–1132.e13. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.043>
 39. Bobadilla, A.-C., Dereschewitz, E., Vaccaro, L., Heinsbroek, J. A., Scofield, M. D., i Kalivas, P. W. (2020). Cocaine and sucrose rewards recruit different seeking ensembles in the nucleus accumbens core. *Molecular Psychiatry*, 25(12), 3150–3163. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00888-z>
 40. Bocksteins, E., Van de Vijver, G., Van Bogaert, P.-P., i Snyders, D. J. (2012). Kv3 channels contribute to the delayed rectifier current in small cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(4), C406–C415. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00343.2011>
 41. Boksa, P. (2010). Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(6), 881–897. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.03.005>
 42. Bosch, M., i Hayashi, Y. (2012). Structural plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.002>
 43. Brambilla, P., Hardan, A., di Nemi, S. U., Perez, J., Soares, J. C., i Barale, F. (2003). Brain anatomy and development in autism: Review of structural MRI studies. *Brain Research Bulletin*, 61(6), 557–569. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2003.06.001>
 44. Breach, M. R., i Lenz, K. M. (2023). Sex Differences in Neurodevelopmental Disorders: A Key Role for the Immune System. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 62, 165–206. https://doi.org/10.1007/7854_2022_308
 45. Brown, A. S., Cohen, P., Harkavy-Friedman, J., Babulas, V., Malaspina, D., Gorman, J. M., i Susser, E. S. (2001). Prenatal rubella, premorbid abnormalities, and adult schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 49(6), 473–486. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01068-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01068-X)
 46. Brown, A. S., i Derkits, E. J. (2010). Prenatal Infection and Schizophrenia: A Review of Epidemiologic and Translational Studies. *The American Journal of Psychiatry*, 167(3), 261–280. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2009.09030361>
 47. Brunette, K. E., Tran, P. V., Wobken, J. D., Carlson, E. S., i Georgieff, M. K. (2010). Gestational and Neonatal Iron Deficiency Alters Apical Dendrite Structure of CA1

- Pyramidal Neurons in Adult Rat Hippocampus. *Developmental Neuroscience*, 32(3), 238–248. <https://doi.org/10.1159/000314341>
48. Buchsbaum, I. Y., i Cappello, S. (2019). Neuronal migration in the CNS during development and disease: Insights from in vivo and in vitro models. *Development*, 146(1), dev163766. <https://doi.org/10.1242/dev.163766>
 49. Bystron, I., Rakic, P., Molnár, Z., i Blakemore, C. (2006). The first neurons of the human cerebral cortex. *Nature Neuroscience*, 9(7), 880–886. <https://doi.org/10.1038/nn1726>
 50. Cai, Z., Pan, Z.-L., Pang, Y., Evans, O. B., i Rhodes, P. G. (2000). Cytokine Induction in Fetal Rat Brains and Brain Injury in Neonatal Rats after Maternal Lipopolysaccharide Administration. *Pediatric Research*, 47(1), 64–64. <https://doi.org/10.1203/00006450-200001000-00013>
 51. Cajigas, I. J., Tushev, G., Will, T. J., tom Dieck, S., Fuerst, N., i Schuman, E. M. (2012). The Local Transcriptome in the Synaptic Neuropil Revealed by Deep Sequencing and High-Resolution Imaging. *Neuron*, 74(3), 453–466. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.036>
 52. Canetta, S., Bolkan, S., Padilla-Coreano, N., Song, L. J., Sahn, R., Harrison, N. L., Gordon, J. A., Brown, A., i Kellendonk, C. (2016). Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. *Molecular Psychiatry*, 21(7), 956–968. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.222>
 53. Carlezon, W. A., Kim, W., Missig, G., Finger, B. C., Landino, S. M., Alexander, A. J., Mokler, E. L., Robbins, J. O., Li, Y., Bolshakov, V. Y., McDougle, C. J., i Kim, K.-S. (2019). Maternal and early postnatal immune activation produce sex-specific effects on autism-like behaviors and neuroimmune function in mice. *Scientific Reports*, 9(1), 16928. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53294-z>
 54. Caruso, C., Carniglia, L., Durand, D., Scimonelli, T. N., i Lasaga, M. (2013). Astrocytes: New targets of melanocortin 4 receptor actions. *Journal of molecular endocrinology*, 51(2), R33–R50. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0064>
 55. Casanova, M. F., El-Baz, A. S., Kamat, S. S., Dombroski, B. A., Khalifa, F., Elnakib, A., Soliman, A., Allison-McNutt, A., i Switala, A. E. (2013). Focal cortical dysplasias in autism spectrum disorders. *Acta Neuropathologica Communications*, 1, 67. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-67>
 56. Catania, A. (2011). *Melanocortins: Multiple Actions and Therapeutic Potential*. Springer Science & Business Media.
 57. Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Oceau, J. C., Yu, X., Cohn, W., Rajendran, P. S., Vondrisk, T. M., Whitelegge, J. P., Coppola, G., i Khakh, B. S. (2017). Neural circuit-specialized astrocytes: Transcriptomic, proteomic, morphological and functional evidence. *Neuron*, 95(3), 531–549. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.029>
 58. Chapleau, C. A., Calfa, G. D., Lane, M. C., Albertson, A. J., Larimore, J. L., Kudo, S., Armstrong, D. L., Percy, A. K., i Pozzo-Miller, L. (2009). Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiology of Disease*, 35(2), 219–233. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.001>
 59. Chaste, P., i Leboyer, M. (2012). Autism risk factors: Genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 14(3), 281–292.

60. Chen, R., Zhou, H., Beltran, J., Malellari, L., i Chang, S. L. (2005). Differential expression of cytokines in the brain and serum during endotoxin tolerance. *Journal of Neuroimmunology*, 163(1), 53–72. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.02.012>
61. Chia, W.-J., Dawe, G. S., i Ong, W.-Y. (2011). Expression and localization of the iron–siderophore binding protein lipocalin 2 in the normal rat brain and after kainate-induced excitotoxicity. *Neurochemistry International*, 59(5), 591–599. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.04.007>
62. Chia, W.-J., Tan, F. C. K., Ong, W.-Y., i Dawe, G. S. (2015). Expression and localisation of brain-type organic cation transporter (BOCT/24p3R/LCN2R) in the normal rat hippocampus and after kainate-induced excitotoxicity. *Neurochemistry International*, 87, 43–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.04.009>
63. Choi, G. B., Yim, Y. S., Wong, H., Kim, S., Kim, H., Kim, S. V., Hoeffler, C. A., Littman, D. R., i Huh, J. R. (2016). The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, 351(6276), 933–939. <https://doi.org/10.1126/science.aad0314>
64. Choi, J., Lee, H.-W., i Suk, K. (2011). Increased plasma levels of lipocalin 2 in mild cognitive impairment. *Journal of the Neurological Sciences*, 305(1), 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.03.023>
65. Christ, A., Herzog, K., i Willnow, T. E. (2016). LRP2, an auxiliary receptor that controls sonic hedgehog signaling in development and disease. *Developmental Dynamics*, 245(5), 569–579. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24394>
66. Chung, R. S., Penkowa, M., Dittmann, J., King, C. E., Bartlett, C., Asmussen, J. W., Hidalgo, J., Carrasco, J., Leung, Y. K. J., Walker, A. K., Fung, S. J., Dunlop, S. A., Fitzgerald, M., Beazley, L. D., Chuah, M. I., Vickers, J. C., i West, A. K. (2008). Redefining the Role of Metallothionein within the Injured Brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(22), 15349–15358. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708446200>
67. Chung, W.-S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L. C., Thompson, A., Chen, C., Smith, S. J., i Barres, B. A. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, 504(7480), 394–400. <https://doi.org/10.1038/nature12776>
68. Cicero, D. C., Martin, E. A., Becker, T. M., i Kerns, J. G. (2014). Reinforcement learning deficits in people with schizophrenia persist after extended trials. *Psychiatry Research*, 220(3), 760–764. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.08.013>
69. Clancy, B., Finlay, B. L., Darlington, R. B., i Anand, K. (2007). Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*, 28(5), 931–937. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.01.014>
70. Coiro, P., Padmashri, R., Suresh, A., Spartz, E., Pendyala, G., Chou, S., Jung, Y., Meays, B., Roy, S., Gautam, N., Alnouti, Y., Li, M., i Dunaevsky, A. (2015). Impaired synaptic development in a maternal immune activation mouse model of neurodevelopmental disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 50, 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.022>
71. Comery, T. A., Harris, J. B., Willems, P. J., Oostra, B. A., Irwin, S. A., Weiler, I. J., i Greenough, W. T. (1997). Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice:

- Maturation and pruning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), 5401–5404.
72. Corradini, I., Focchi, E., Rasile, M., Morini, R., Desiato, G., Tomasoni, R., Lizier, M., Ghirardini, E., Fesce, R., Morone, D., Barajon, I., Antonucci, F., Pozzi, D., i Matteoli, M. (2018). Maternal Immune Activation Delays Excitatory-to-Inhibitory Gamma-Aminobutyric Acid Switch in Offspring. *Biological Psychiatry*, 83(8), 680–691. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.09.030>
 73. Cotter, J., Granger, K., Backx, R., Hobbs, M., Looi, C. Y., i Barnett, J. H. (2018). Social cognitive dysfunction as a clinical marker: A systematic review of meta-analyses across 30 clinical conditions. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 84, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.11.014>
 74. Couch, A. C. M., Berger, T., Hanger, B., Matuleviciute, R., Srivastava, D. P., Thuret, S., i Vernon, A. C. (2021). Maternal immune activation primes deficiencies in adult hippocampal neurogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 97, 410–422. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.07.021>
 75. Cowland, J. B., i Borregaard, N. (1997). Molecular Characterization and Pattern of Tissue Expression of the Gene for Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin from Humans. *Genomics*, 45(1), 17–23. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4896>
 76. Cramer, E. P., Glenthøj, A., Häger, M., Juncker-Jensen, A., Engelholm, L. H., Santoni-Rugiu, E., Lund, L. R., Laerum, O. D., Cowland, J. B., i Borregaard, N. (2012). No Effect of NGAL/lipocalin-2 on Aggressiveness of Cancer in the MMTV-PyMT/FVB/N Mouse Model for Breast Cancer. *PLOS ONE*, 7(6), e39646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039646>
 77. Cruz-Martín, A., Crespo, M., i Portera-Cailliau, C. (2010). Delayed Stabilization of Dendritic Spines in Fragile X Mice. *The Journal of Neuroscience*, 30(23), 7793–7803. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0577-10.2010>
 78. Cui, K., Ashdown, H., Luheshi, G. N., i Boksa, P. (2009). Effects of prenatal immune activation on hippocampal neurogenesis in the rat. *Schizophrenia Research*, 113(2–3), 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2009.05.003>
 79. da Silveira, V. T., Medeiros, D. de C., Ropke, J., Guidine, P. A., Rezende, G. H., Moraes, M. F. D., Mendes, E. M. A. M., Macedo, D., Moreira, F. A., i de Oliveira, A. C. P. (2017). Effects of early or late prenatal immune activation in mice on behavioral and neuroanatomical abnormalities relevant to schizophrenia in the adulthood. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 58, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.01.009>
 80. De La Chesnaye, E., Manuel-Apolinar, L., Damasio, L., Olivares, A., Palomino, M. A., Santos, I., i Méndez, J. P. (2018). Expression profiling of lipocalin-2 and 24p3 receptor in murine gonads at different developmental stages. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(1), 213–221. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6196>
 81. Dekens, D. W., Naudé, P. J. W., Keijser, J. N., Boerema, A. S., De Deyn, P. P., i Eisel, U. L. M. (2018). Lipocalin 2 contributes to brain iron dysregulation but does not affect cognition, plaque load, and glial activation in the J20 Alzheimer mouse model. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 330. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1372-5>
 82. Depino, A. M. (2015). Early prenatal exposure to LPS results in anxiety- and depression-related behaviors in adulthood. *Neuroscience*, 299, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.065>

83. Deverman, B. E., i Patterson, P. H. (2009). Cytokines and CNS Development. *Neuron*, 64(1), 61–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.002>
84. Devireddy, L. R., Gazin, C., Zhu, X., i Green, M. R. (2005). A Cell-Surface Receptor for Lipocalin 24p3 Selectively Mediates Apoptosis and Iron Uptake. *Cell*, 123(7), 1293–1305. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.027>
85. Devireddy, L. R., Teodoro, J. G., Richard, F. A., i Green, M. R. (2001). Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science*, 293(5531), 829–834. <https://doi.org/10.1126/science.1061075>
86. Dixit, P. V., Sahu, R., i Mishra, D. K. (2020). Marble-burying behavior test as a murine model of compulsive-like behavior. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 102, 106676. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2020.106676>
87. D’Mello, A. (2022). *How scientists can counteract their unwitting contributions to autism’s sex bias*. The Transmitter: Neuroscience News and Perspectives. <https://www.thetransmitter.org/spectrum/how-scientists-can-counteract-their-unwitting-contributions-to-autisms-sex-bias/>
88. Doliwa, M., Kuzniewska, B., Nader, K., Reniewicz, P., Kaczmarek, L., Michaluk, P., i Kalita, K. (2024). Astrocyte-Secreted Lcn2 Modulates Dendritic Spine Morphology. <https://doi.org/10.20944/preprints202410.2555.v1>
89. Du, Z., Wu, B., Xia, Q., Zhao, Y., Lin, L., Cai, Z., Wang, S., Li, E., Xu, L., Li, Y., Xu, H., i Yin, D. (2019). LCN2-interacting proteins and their expression patterns in brain tumors. *Brain Research*, 1720, 146304. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146304>
90. Dunaevsky, A., i Bergdolt, L. (2019). Brain changes in a maternal Immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. *Progress in neurobiology*, 175, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.002>
91. Dutra, M. L., Dias, P., Freiburger, V., Ventura, L., Comim, C. M., Martins, D. F., i Bobinski, F. (2023). Maternal immune activation induces autism-like behavior and reduces brain-derived neurotrophic factor levels in the hippocampus and offspring cortex of C57BL/6 mice. *Neuroscience Letters*, 793, 136974. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136974>
92. Edmonson, C., Ziats, M. N., i Rennert, O. M. (2014). Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. *Molecular Autism*, 5, 3. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-3>
93. Elneihoum, A. M., Falke, P., Axelsson, L., Lundberg, E., Lindgärde, F., i Ohlsson, K. (1996). Leukocyte activation detected by increased plasma levels of inflammatory mediators in patients with ischemic cerebrovascular diseases. *Stroke*, 27(10), 1734–1738. <https://doi.org/10.1161/01.str.27.10.1734>
94. England-Mason, G. (2020). Emotion Regulation as a Transdiagnostic Feature in Children with Neurodevelopmental Disorders. *Current Developmental Disorders Reports*, 7(3), 130–138. <https://doi.org/10.1007/s40474-020-00200-2>
95. Escobar, M., Crouzin, N., Cavalier, M., Quentin, J., Roussel, J., Lanté, F., Batista-Novais, A. R., Cohen-Solal, C., De Jesus Ferreira, M.-C., Guiramand, J., Barbanel, G., i Vignes, M. (2011). Early, Time-Dependent Disturbances of Hippocampal Synaptic Transmission and Plasticity After In Utero Immune Challenge. *Biological Psychiatry*, 70(10), 992–999. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.01.009>

96. Estes, M. L., i McAllister, A. K. (2016). Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*, 353(6301), 772–777. <https://doi.org/10.1126/science.aag3194>
97. Falcone, C., Penna, E., Hong, T., Tarantal, A. F., Hof, P. R., Hopkins, W. D., Sherwood, C. C., Noctor, S. C., i Martínez-Cerdeño, V. (2020). Cortical Interlaminar Astrocytes Are Generated Prenatally, Mature Postnatally, and Express Unique Markers in Human and Nonhuman Primates. *Cerebral Cortex* 31(1), 379–395. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa231>
98. Fan, H., i Cook, J. A. (2004). Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *Journal of Endotoxin Research*, 10(2), 71–84. <https://doi.org/10.1179/096805104225003997>
99. Farhy-Tselnicker, I., i Allen, N. J. (2018). Astrocytes, neurons, synapses: A tripartite view on cortical circuit development. *Neural Development*, 13(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13064-018-0104-y>
100. Fatemi, S. H., Emamian, E. S., Kist, D., Sidwell, R. W., Nakajima, K., Akhter, P., Shier, A., Sheikh, S., i Bailey, K. (1999). Defective corticogenesis and reduction in Reelin immunoreactivity in cortex and hippocampus of prenatally infected neonatal mice. *Molecular Psychiatry*, 4(2), 145–154. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000520>
101. Fatemi, S. H., i Folsom, T. D. (2009). The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3), 528–548. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn187>
102. Fernández de Cossío, L., Guzmán, A., van der Veldt, S., i Luheshi, G. N. (2017). Prenatal infection leads to ASD-like behavior and altered synaptic pruning in the mouse offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 63, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.09.028>
103. Fernández, M., Mollinedo-Gajate, I., i Peñagarikano, O. (2018). Neural Circuits for Social Cognition: Implications for Autism. *Neuroscience*, 370, 148–162. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.013>
104. Ferreira, A. C., i Marques, F. (2023). The Effects of Stress on Hippocampal Neurogenesis and Behavior in the Absence of Lipocalin-2. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/ijms242115537>
105. Ferreira, A. C., Pinto, V., Dá Mesquita, S., Novais, A., Sousa, J. C., Correia-Neves, M., Sousa, N., Palha, J. A., i Marques, F. (2013). Lipocalin-2 is involved in emotional behaviors and cognitive function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 122. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00122>
106. Ferreira, A. C., Santos, T., Sampaio-Marques, B., Novais, A., Mesquita, S. D., Ludovico, P., Bernardino, L., Correia-Neves, M., Sousa, N., Palha, J. A., Sousa, J. C., i Marques, F. (2018). Lipocalin-2 regulates adult neurogenesis and contextual discriminative behaviours. *Molecular Psychiatry*, 23(4), 1031–1039. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.95>
107. Ferreira, A. C., Sousa, N., Sousa, J. C., i Marques, F. (2023). Age-related changes in mice behavior and the contribution of lipocalin-2. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1179302>
108. Fiala, J. C., Feinberg, M., Popov, V., i Harris, K. M. (1998). Synaptogenesis Via Dendritic Filopodia in Developing Hippocampal Area CA1. *Journal of*

- Neuroscience*, 18(21), 8900–8911. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08900.1998>
109. Fillman, S. G., Cloonan, N., Catts, V. S., Miller, L. C., Wong, J., McCrossin, T., Cairns, M., i Weickert, C. S. (2013). Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 18(2), 206–214. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.110>
 110. Fisher, C. E., i Howie, S. E. M. (2006). The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Developmental Biology*, 296(2), 279–297. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.007>
 111. Flo, T. H., Smith, K. D., Sato, S., Rodriguez, D. J., Holmes, M. A., Strong, R. K., Akira, S., i Aderem, A. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*, 432(7019), 917–921. <https://doi.org/10.1038/nature03104>
 112. Flower, D. R. (1996). The lipocalin protein family: Structure and function. *Biochemical Journal*, 318(1), 1–14.
 113. Friedl, A., Stoesz, S. P., Buckley, P., i Gould, M. N. (1999). Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin in Normal and Neoplastic Human Tissues. Cell Type-specific Pattern of Expression. *The Histochemical Journal*, 31(7), 433–441. <https://doi.org/10.1023/A:1003708808934>
 114. Furukawa, T., Shimoyama, S., Miki, Y., Nikaido, Y., Koga, K., Nakamura, K., Wakabayashi, K., i Ueno, S. (2017). Chronic diazepam administration increases the expression of Lcn2 in the CNS. *Pharmacology Research & Perspectives*, 5(1), e00283. <https://doi.org/10.1002/prp2.283>
 115. Gallego, J. A., Blanco, E. A., Husain-Krautter, S., Fagen, E. M., Moreno-Merino, P., del Ojo-Jiménez, J. A., Ahmed, A., Rothstein, T. L., Lencz, T., i Malhotra, A. K. (2018). Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Patients with Schizophrenia Spectrum Disorders: New Data and an Updated Meta-analysis. *Schizophrenia research*, 202, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.07.019>
 116. Galvez, R., i Greenough, W. T. (2005). Sequence of abnormal dendritic spine development in primary somatosensory cortex of a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 135A(2), 155–160. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30709>
 117. Garay, P. A., Hsiao, E. Y., Patterson, P. H., i McAllister, A. K. (2013). Maternal immune activation causes age- and region-specific changes in brain cytokines in offspring throughout development. *Brain, Behavior, and Immunity*, 31, 54–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.07.008>
 118. Garay-Rojas, E., Harper, M., Hrabá-Renevey, S., i Kress, M. (1996). An apparent autocrine mechanism amplifies the dexamethasone- and retinoic acid-induced expression of mouse lipocalin-encoding gene *24p3*. *Gene*, 170(2), 173–180. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00896-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00896-9)
 119. García-Moreno, F., López-Mascaraque, L., i De Carlos, J. A. (2007). Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. *The Journal of Comparative Neurology*, 500(3), 419–432. <https://doi.org/10.1002/cne.21128>
 120. Garey, L., Ong, W., Patel, T., Kanani, M., Davis, A., Mortimer, A., Barnes, T., i Hirsch, S. (1998). Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 65(4), 446–453.

121. Gasterich, N., Wetz, S., Tillmann, S., Fein, L., Seifert, A., Slowik, A., Weiskirchen, R., Zendedel, A., Ludwig, A., Koschmieder, S., Beyer, C., i Clarner, T. (2021). Inflammatory Responses of Astrocytes Are Independent from Lipocalin 2. *Journal of Molecular Neuroscience*, 71(5), 933–942. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01712-7>
122. Gayle, D. A., Beloosesky, R., Desai, M., Amidi, F., Nuñez, S. E., i Ross, M. G. (2004). Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(6), R1024–1029. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00664.2003>
123. Gilman, S. R., Iossifov, I., Levy, D., Ronemus, M., Wigler, M., i Vitkup, D. (2011). Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron*, 70(5), 898–907. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.021>
124. Gilmore, J. H., Jarskog, L. F., i Vadlamudi, S. (2005). Maternal poly I:C exposure during pregnancy regulates TNF alpha, BDNF, and NGF expression in neonatal brain and the maternal-fetal unit of the rat. *Journal of Neuroimmunology*, 159(1–2), 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.10.008>
125. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., i Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
126. Giovanoli, S., Notter, T., Richetto, J., Labouesse, M. A., Vuillermot, S., Riva, M. A., i Meyer, U. (2015). Late prenatal immune activation causes hippocampal deficits in the absence of persistent inflammation across aging. *Journal of Neuroinflammation*, 12, 221. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0437-y>
127. Giovanoli, S., Weber-Stadlbauer, U., Schedlowski, M., Meyer, U., i Engler, H. (2016). Prenatal immune activation causes hippocampal synaptic deficits in the absence of overt microglia anomalies. *Brain, Behavior, and Immunity*, 55, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.015>
128. Girard, S., i Sebire, G. (2016). Transplacental Transfer of Interleukin-1 Receptor Agonist and Antagonist Following Maternal Immune Activation. *American Journal of Reproductive Immunology*, 75(1), 8–12. <https://doi.org/10.1111/aji.12444>
129. Girard, S., Tremblay, L., Lepage, M., i Sébire, G. (2010). IL-1 Receptor Antagonist Protects against Placental and Neurodevelopmental Defects Induced by Maternal Inflammation. *The Journal of Immunology*, 184(7), 3997–4005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903349>
130. Glantz, L. A., i Lewis, D. A. (2000). Decreased Dendritic Spine Density on Prefrontal Cortical Pyramidal Neurons in Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 57(1), 65–73. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.1.65>
131. Goeden, N., Velasquez, J., Arnold, K. A., Chan, Y., Lund, B. T., Anderson, G. M., i Bonnin, A. (2016). Maternal Inflammation Disrupts Fetal Neurodevelopment via Increased Placental Output of Serotonin to the Fetal Brain. *The Journal of Neuroscience*, 36(22), 6041–6049. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2534-15.2016>

132. Goetz, D. H., Holmes, M. A., Borregaard, N., Bluhm, M. E., Raymond, K. N., i Strong, R. K. (2002). The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Molecular Cell*, 10(5), 1033–1043. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00708-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00708-6)
133. Golan, H. M., Lev, V., Hallak, M., Sorokin, Y., i Huleihel, M. (2005). Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology*, 48(6), 903–917. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.12.023>
134. Gold, J. M., Waltz, J. A., Prentice, K. J., Morris, S. E., i Heerey, E. A. (2008). Reward processing in schizophrenia: A deficit in the representation of value. *Schizophrenia Bulletin*, 34(5), 835–847. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn068>
135. Goldsmith, D. R., Rapaport, M. H., i Miller, B. J. (2016). A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: Comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Molecular Psychiatry*, 21(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.3>
136. Goldstein, S. A. N., Bockenhauer, D., O’Kelly, I., i Zilberberg, N. (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of two-p-domain subunits. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(3), 175–184. <https://doi.org/10.1038/35058574>
137. Gomes, J. R., Lobo, A., Nogueira, R., Terceiro, A. F., Costelha, S., Lopes, I. M., Magalhães, A., Summavielle, T., i Saraiva, M. J. (2020). Neuronal megalin mediates synaptic plasticity—A novel mechanism underlying intellectual disabilities in megalin gene pathologies. *Brain Communications*, 2(2), fcaa135. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa135>
138. Gomes, J. R., Nogueira, R., Vieira, M., Santos, S., Ferraz-Nogueira, J. P., Relvas, J. B., i Saraiva, M. J. (2016). Transthyretin provides trophic support via megalin by promoting neurite outgrowth and neuroprotection in cerebral ischemia. *Cell Death and Differentiation*, 23(11), 1749–1764. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.64>
139. Götz, M., i Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>
140. Grant, S. G. N. (2012). Synaptopathies: Diseases of the synaptome. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.02.002>
141. Gravina, G., Ardan, M., Chumak, T., Nilsson, A. K., Ek, J. C., Danielsson, H., Svedin, P., Pekny, M., Pekna, M., Sävman, K., Hellström, A., i Mallard, C. (2023). Proteomics identifies lipocalin-2 in neonatal inflammation associated with cerebrovascular alteration in mice and preterm infants. *iScience*, 26(7). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107217>
142. Griego, E., Hernández-Frausto, M., Márquez, L. A., Lara-Valderrabano, L., López Rubalcava, C., i Galván, E. J. (2022). Activation of D1/D5 receptors ameliorates decreased intrinsic excitability of hippocampal neurons induced by neonatal blockade of N-methyl-d-aspartate receptors. *British Journal of Pharmacology*, 179(8), 1695–1715. <https://doi.org/10.1111/bph.15735>
143. Griego, E., Segura-Villalobos, D., Lamas, M., i Galván, E. J. (2022). Maternal immune activation increases excitability via downregulation of A-type potassium channels and reduces dendritic complexity of hippocampal neurons of the

- offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 105, 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.07.005>
144. Grigoryev, D. N., Liu, M., Hassoun, H. T., Cheadle, C., Barnes, K. C., i Rabb, H. (2008). The local and systemic inflammatory transcriptome after acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(3), 547–558. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007040469>
 145. Guma, E., Plitman, E., i Chakravarty, M. M. (2019). The role of maternal immune activation in altering the neurodevelopmental trajectories of offspring: A translational review of neuroimaging studies with implications for autism spectrum disorder and schizophrenia. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 104, 141–157. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.06.020>
 146. Gumusoglu, S. B., i Stevens, H. E. (2019). Maternal Inflammation and Neurodevelopmental Programming: A Review of Preclinical Outcomes and Implications for Translational Psychiatry. *Biological Psychiatry*, 85(2), 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.08.008>
 147. Gzielo, K., Potasiewicz, A., Litwa, E., Piotrowska, D., Popik, P., i Nikiforuk, A. (2021). The Effect of Maternal Immune Activation on Social Play-Induced Ultrasonic Vocalization in Rats. *Brain Sciences*, 11(3), 344. <https://doi.org/10.3390/brainsci11030344>
 148. Gzielo, K., Piotrowska, D., Litwa, E., Popik, P., i Nikiforuk, A. (2023). Maternal immune activation affects socio-communicative behavior in adult rats. *Scientific Reports*, 13(1), 1918. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28919-z>
 149. Hadar, R., Dong, L., Del-Valle-Anton, L., Guneykaya, D., Voget, M., Edemann-Callesen, H., Schweibold, R., Djodari-Irani, A., Goetz, T., Ewing, S., Kettenmann, H., Wolf, S. A., i Winter, C. (2017). Deep brain stimulation during early adolescence prevents microglial alterations in a model of maternal immune activation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 63, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.003>
 150. Hall, M. B., Willis, D. E., Rodriguez, E. L., i Schwarz, J. M. (2023). Maternal immune activation as an epidemiological risk factor for neurodevelopmental disorders: Considerations of timing, severity, individual differences, and sex in human and rodent studies. *Frontiers in Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1135559>
 151. Hamzic, N., Blomqvist, A., i Nilsberth, C. (2013). Immune-Induced Expression of Lipocalin-2 in Brain Endothelial Cells: Relationship with Interleukin-6, Cyclooxygenase-2 and the Febrile Response. *Journal of Neuroendocrinology*, 25(3), 271–280. <https://doi.org/10.1111/jne.12000>
 152. Han, V. X., Patel, S., Jones, H. F., i Dale, R. C. (2021). Maternal immune activation and neuroinflammation in human neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews Neurology*, 17(9), 564–579. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00530-8>
 153. Han, V. X., Patel, S., Jones, H. F., Nielsen, T. C., Mohammad, S. S., Hofer, M. J., Gold, W., Brilot, F., Lain, S. J., Nassar, N., i Dale, R. C. (2021). Maternal acute and chronic inflammation in pregnancy is associated with common neurodevelopmental disorders: A systematic review. *Translational Psychiatry*, 11(1), 71. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01198-w>

154. Han, X., Li, N., Meng, Q., Shao, F., i Wang, W. (2011). Maternal immune activation impairs reversal learning and increases serum tumor necrosis factor- α in offspring. *Neuropsychobiology*, 64(1), 9–14. <https://doi.org/10.1159/000322455>
155. Hansen, D. V., Lui, J. H., Flandin, P., Yoshikawa, K., Rubenstein, J. L., Alvarez-Buylla, A., i Kriegstein, A. R. (2013). Non-epithelial stem cells and cortical interneuron production in the human ganglionic eminences. *Nature neuroscience*, 16(11), 1576–1587. <https://doi.org/10.1038/nn.3541>
156. Hao, L. Y., Hao, X. Q., Li, S. H., i Li, X. H. (2010). Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in cognitive deficits in age-increasing offspring rats. *Neuroscience*, 166(3), 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.006>
157. Harrison, P. J. (2004). The hippocampus in schizophrenia: A review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology*, 174(1), 151–162. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1761-y>
158. Harvey, L., i Boksa, P. (2012). A stereological comparison of GAD67 and reelin expression in the hippocampal stratum oriens of offspring from two mouse models of maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology*, 62(4), 1767–1776. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.11.022>
159. Hashim, H., Abdelrahman, H., Mohammed, D., i Karam, R. (2013). Association between plasma levels of transforming growth factor- β 1, IL-23 and IL-17 and the severity of autism in Egyptian children. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 7(1), 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.rasd.2012.08.007>
160. Hayashi, Y., i Majewska, A. K. (2005). Dendritic Spine Geometry: Functional Implication and Regulation. *Neuron*, 46(4), 529–532. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.006>
161. Haynes, R. L., i Kinney, H. C. (2011). Central Axonal Development and Pathology in Early Life. *Cytoskeleton of the Nervous System*, 1–53. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6787-9_1
162. He, L.-X., Wan, L., Xiang, W., Li, J.-M., Pan, A.-H., i Lu, D.-H. (2020). Synaptic development of layer V pyramidal neurons in the prenatal human prefrontal neocortex: A Neurolucida-aided Golgi study. *Neural Regeneration Research*, 15(8), 1490–1495. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.274345>
163. Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S. H. R., i Rusakov, D. A. (2010). Long-term potentiation depends on release of d-serine from astrocytes. *Nature*, 463(7278), Article 7278. <https://doi.org/10.1038/nature08673>
164. Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., i Kurachi, Y. (2010). Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiological Reviews*, 90(1), 291–366. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009>
165. Hilal, M. L., Rosina, E., Pedini, G., Restivo, L., i Bagni, C. (2024). Dysregulation of the mTOR-FMRP pathway and synaptic plasticity in an environmental model of ASD. *Molecular Psychiatry*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41380-024-02805-0>

166. Hinton, V. J., Brown, W. T., Wisniewski, K., i Rudelli, R. D. (1991). Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 41(3), 289–294. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320410306>
167. Hofer, S. B., Mrcic-Flogel, T. D., Bonhoeffer, T., i Hübener, M. (2009). Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature*, 457(7227), 313–317. <https://doi.org/10.1038/nature07487>
168. Holmes, M. A., Paulsene, W., Jide, X., Ratledge, C., i Strong, R. K. (2005). Siderocalin (Lcn 2) Also Binds Carboxymycobactins, Potentially Defending against Mycobacterial Infections through Iron Sequestration. *Structure*, 13(1), 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.10.009>
169. Holst, C. B., Brøchner, C. B., Vitting-Seerup, K., i Møllgård, K. (2019). Astroglialogenesis in human fetal brain: Complex spatiotemporal immunoreactivity patterns of GFAP, S100, AQP4 and YKL-40. *Journal of Anatomy*, 235(3), 590–615. <https://doi.org/10.1111/joa.12948>
170. Holtmaat, A., i Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(9), 647–658. <https://doi.org/10.1038/nrn2699>
171. Hooley, J. M. (2010). Social Factors in Schizophrenia. *Current Directions in Psychological Science*, 19(4), 238–242. <https://doi.org/10.1177/0963721410377597>
172. Hopkins, S. J., i Rothwell, N. J. (1995). Cytokines and the nervous system I: Expression and recognition. *Trends in Neurosciences*, 18(2), 83–88. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)80029-2](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)80029-2)
173. Hsiao, E. Y., i Patterson, P. H. (2012). Placental regulation of maternal-fetal interactions and brain development. *Developmental Neurobiology*, 72(10), 1317–1326. <https://doi.org/10.1002/dneu.22045>
174. Hsueh, P.-T., Wang, H.-H., Liu, C.-L., Ni, W.-F., Chen, Y.-L., i Liu, J.-K. (2017). Expression of cerebral serotonin related to anxiety-like behaviors in C57BL/6 offspring induced by repeated subcutaneous prenatal exposure to low-dose lipopolysaccharide. *PloS One*, 12(6), e0179970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179970>
175. Huang, H. L., Chu, S. T., i Chen, Y. H. (1999). Ovarian steroids regulate 24p3 expression in mouse uterus during the natural estrous cycle and the preimplantation period. *Journal of Endocrinology*, 162(1), 11–19. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1620011>
176. Hui, C. W., Vecchiarelli, H. A., Gervais, É., Luo, X., Michaud, F., Scheefhals, L., Bisht, K., Sharma, K., Topolnik, L., i Tremblay, M.-È. (2020). Sex Differences of Microglia and Synapses in the Hippocampal Dentate Gyrus of Adult Mouse Offspring Exposed to Maternal Immune Activation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.558181>
177. Hutsler, J. J., i Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Research*, 1309, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.120>
178. Iannetti, A., Pacifico, F., Acquaviva, R., Lavorgna, A., Crescenzi, E., Vascotto, C., Tell, G., Salzano, A. M., Scaloni, A., Vuttariello, E., Chiappetta, G., Formisano, S., i Leonardi, A. (2008). The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a NF-kappaB-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(37), 14058–14063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710846105>
179. Ikezu, S., Yeh, H., Delpech, J.-C., Woodbury, M. E., Van Enoo, A. A., Ruan, Z., Sivakumaran, S., You, Y., Holland, C., Guillaumon-Vivancos, T., Yoshii-Kitahara, A., Botros, M. B., Madore, C., Chao, P.-H., Desani, A., Manimaran, S., Kalavai, S. V., Johnson, W. E., Butovsky, O., ... Ikezu, T. (2020). Inhibition of colony stimulating factor 1 receptor corrects maternal inflammation-induced microglial and synaptic dysfunction and behavioral abnormalities. *Molecular Psychiatry*, 1–24. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0671-2>
 180. Ip, J. P. K., Noçon, A. L., Hofer, M. J., Lim, S. L., Müller, M., i Campbell, I. L. (2011). Lipocalin 2 in the central nervous system host response to systemic lipopolysaccharide administration. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 124. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-124>
 181. Irwin, S. A., Idupulapati, M., Gilbert, M. E., Harris, J. B., Chakravarti, A. B., Rogers, E. J., Crisostomo, R. A., Larsen, B. P., Mehta, A., Alcantara, C. J., Patel, B., Swain, R. A., Weiler, I. J., Oostra, B. A., i Greenough, W. T. (2002). Dendritic spine and dendritic field characteristics of layer V pyramidal neurons in the visual cortex of fragile-X knockout mice. *American Journal of Medical Genetics*, 111(2), 140–146. <https://doi.org/10.1002/ajmg.10500>
 182. Irwin, S. A., Patel, B., Idupulapati, M., Harris, J. B., Crisostomo, R. A., Larsen, B. P., Kooy, F., Willems, P. J., Cras, P., Kozlowski, P. B., Swain, R. A., Weiler, I. J., i Greenough, W. T. (2001). Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: A quantitative examination. *American Journal of Medical Genetics*, 98(2), 161–167. [https://doi.org/10.1002/1096-8628\(20010115\)98:2<161::aid-ajmg1025>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/1096-8628(20010115)98:2<161::aid-ajmg1025>3.0.co;2-b)
 183. Ito, H. T., Smith, S. E. P., Hsiao, E., i Patterson, P. H. (2010). Maternal Immune Activation Alters Nonspatial Information Processing in the Hippocampus of the Adult Offspring. *Brain, behavior, and immunity*, 24(6), 930–941. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.03.004>
 184. Jaber, S. A., Cohen, A., D'Souza, C., Abdulrazzaq, Y. M., Ojha, S., Bastaki, S., i Adeghate, E. A. (2021). Lipocalin-2: Structure, function, distribution and role in metabolic disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112002. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112002>
 185. Jakovcevski, I., Filipovic, R., Mo, Z., Rakic, S., i Zecevic, N. (2009). Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Frontiers in Neuroanatomy*, 3. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.005.2009>
 186. Jang, E., Lee, S., Kim, J.-H., Kim, J.-H., Seo, J.-W., Lee, W.-H., Mori, K., Nakao, K., i Suk, K. (2013). Secreted protein lipocalin-2 promotes microglial M1 polarization. *The FASEB Journal*, 27(3), 1176–1190. <https://doi.org/10.1096/fj.12-222257>
 187. Jeon, S., Jha, M. K., Ock, J., Seo, J., Jin, M., Cho, H., Lee, W.-H., i Suk, K. (2013). Role of Lipocalin-2-Chemokine Axis in the Development of Neuropathic Pain following Peripheral Nerve Injury. *Journal of Biological Chemistry*, 288(33), 24116–24127. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.454140>
 188. Jeremic, D., Sanchez-Rodriguez, I., Jimenez-Diaz, L., i Navarro-Lopez, J. D. (2021). Therapeutic potential of targeting G protein-gated inwardly rectifying

- potassium (GIRK) channels in the central nervous system. *Pharmacology & Therapeutics*, 223, 107808. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107808>
189. Jha, M. K., Lee, S., Park, D. H., Kook, H., Park, K.-G., Lee, I.-K., i Suk, K. (2015). Diverse functional roles of lipocalin-2 in the central nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 49, 135–156. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.12.006>
 190. Jiang, H., Xu, L., Shao, L., Xia, R., Yu, Z., Ling, Z., Yang, F., Deng, M., i Ruan, B. (2016). Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 58, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.005>
 191. Jiang, J.-H., Wang, S.-Y., Zhang, J., Liu, H., Ke, K.-X., Jiang, Y., Liu, L., Liu, S.-Y., Gao, X., i He, B.-C. (2023). LCN2 Inhibits the BMP9-induced Osteogenic Differentiation through Reducing Wnt/ β -catenin Signaling via Interacting with LRP6 in Mouse Embryonic Fibroblasts. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 18(8), 1160–1171. <https://doi.org/10.2174/1574888X18666230320091546>
 192. Jin, M., Jang, E., i Suk, K. (2014). Lipocalin-2 Acts as a Neuroinflammation in Lipopolysaccharide-injected Mice. *Experimental Neurobiology*, 23(2), 155–162. <https://doi.org/10.5607/en.2014.23.2.155>
 193. Jin, M., Kim, J.-H., Jang, E., Lee, Y. M., Han, H. S., Woo, D. K., Park, D. H., Kook, H., i Suk, K. (2014). Lipocalin-2 Deficiency Attenuates Neuroinflammation and Brain Injury after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(8), 1306–1314. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.83>
 194. Jo, D., Jung, Y. S., i Song, J. (2023). Lipocalin-2 Secreted by the Liver Regulates Neuronal Cell Function Through AKT-Dependent Signaling in Hepatic Encephalopathy Mouse Model. *Clinical Nutrition Research*, 12(2), 154–167. <https://doi.org/10.7762/cnr.2023.12.2.154>
 195. Kang, S. S., Ren, Y., Liu, C.-C., Kurti, A., Baker, K. E., Bu, G., Asmann, Y., i Fryer, J. D. (2018). Lipocalin-2 protects the brain during inflammatory conditions. *Molecular Psychiatry*, 23(2), 344–350. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.243>
 196. Katsel, P., Byne, W., Roussos, P., Tan, W., Siever, L., i Haroutunian, V. (2011). Astrocyte and Glutamate Markers in the Superficial, Deep, and White Matter Layers of the Anterior Cingulate Gyrus in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 36(6), 1171–1177. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.252>
 197. Kelly, J. R., Minuto, C., Cryan, J. F., Clarke, G., i Dinan, T. G. (2017). Cross Talk: The Microbiota and Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00490>
 198. Kent, A. S. H., Sullivan, M. H. F., i Elder, M. G. (1994). *Transfer of cytokines through human fetal membranes*. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1000081>
 199. Kentner, A. C., Bilbo, S. D., Brown, A. S., Hsiao, E. Y., McAllister, A. K., Meyer, U., Pearce, B. D., Pletnikov, M. V., Yolken, R. H., i Bauman, M. D. (2019). Maternal immune activation: Reporting guidelines to improve the rigor, reproducibility, and transparency of the model. *Neuropsychopharmacology*, 44(2), 245–258. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0185-7>
 200. Kessel, J. C., Weiskirchen, R., i Schröder, S. K. (2023). Expression Analysis of Lipocalin 2 (LCN2) in Reproductive and Non-Reproductive Tissues of Esr1-Deficient

- Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9280. <https://doi.org/10.3390/ijms24119280>
201. Khalaf-Nazzal, R., i Francis, F. (2013). Hippocampal development – Old and new findings. *Neuroscience*, 248, 225–242. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.061>
 202. Khandaker, G. M., Zimbron, J., Lewis, G., i Jones, P. B. (2013). Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: A systematic review of population-based studies. *Psychological Medicine*, 43(2), 239–257. <https://doi.org/10.1017/S0033291712000736>
 203. Kim, J.-H., Kang, R. J., Hyeon, S. J., Ryu, H., Joo, H., Bu, Y., Kim, J.-H., i Suk, K. (2023). Lipocalin-2 Is a Key Regulator of Neuroinflammation in Secondary Traumatic and Ischemic Brain Injury. *Neurotherapeutics*, 20(3), 803–821. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01333-5>
 204. Kim, J.-H., Michiko, N., Choi, I.-S., Kim, Y., Jeong, J.-Y., Lee, M.-G., Jang, I.-S., i Suk, K. (2024). Aberrant activation of hippocampal astrocytes causes neuroinflammation and cognitive decline in mice. *PLOS Biology*, 22(7), e3002687. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002687>
 205. Kirkby, L., Sack, G., Firl, A., i Feller, M. B. (2013). A role for correlated spontaneous activity in the assembly of neural circuits. *Neuron*, 80(5), 1129. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.030>
 206. Kirsch, A. C., Huebner, A. R. S., Mehta, S. Q., Howie, F. R., Weaver, A. L., Myers, S. M., Voigt, R. G., i Katusic, S. K. (2020). Association of Comorbid Mood and Anxiety Disorders With Autism Spectrum Disorder. *JAMA Pediatrics*, 174(1), 63–70. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2019.4368>
 207. Kirsten, T. B., i Bernardi, M. M. (2017). Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: Repetitive self-grooming and stereotypies. *Behavioural Brain Research*, 331, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.013>
 208. Kiryk, A., Janusz, A., Zglinicki, B., Turkes, E., Knapska, E., Konopka, W., Lipp, H.-P., i Kaczmarek, L. (2020). IntelliCage as a tool for measuring mouse behavior—20 years perspective. *Behavioural Brain Research*, 388, 112620. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112620>
 209. Kjeldsen, L., Johnsen, A. H., Sengeløv, H., i Borregaard, N. (1993). Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(14), 10425–10432. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)82217-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)82217-7)
 210. Kleinmans, M., i Bilkey, D. K. (2018). Reversal learning impairments in the maternal immune activation rat model of schizophrenia. *Behavioral Neuroscience*, 132(6), 520–525. <https://doi.org/10.1037/bne0000275>
 211. Klüber, P., Meurer, S. K., Lambert, J., Schwarz, R., Zechel-Gran, S., Braunschweig, T., Hurka, S., Domann, E., i Weiskirchen, R. (2021). Depletion of Lipocalin 2 (LCN2) in Mice Leads to Dysbiosis and Persistent Colonization with Segmented Filamentous Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/ijms222313156>
 212. Knapska, E., Lioudyno, V., Kiryk, A., Mikosz, M., Górkiewicz, T., Michaluk, P., Gawlak, M., Chaturvedi, M., Mochol, G., Balcerzyk, M., Wojcik, D. K., Wilczynski, G. M., i Kaczmarek, L. (2013). Reward learning requires activity of matrix

- metalloproteinase-9 in the central amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 33(36), 14591–14600. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5239-12.2013>
213. Knapska, E., Walasek, G., Nikolaev, E., Neuhäusser-Wespy, F., Lipp, H.-P., Kaczmarek, L., i Werka, T. (2006). Differential involvement of the central amygdala in appetitive versus aversive learning. *Learning & Memory*, 13(2), 192–200. <https://doi.org/10.1101/lm.54706>
 214. Knudsen, E. I. (2004). Sensitive periods in the development of the brain and behavior. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 16(8), 1412–1425. <https://doi.org/10.1162/0898929042304796>
 215. Koga, K., Cardenas, I., Aldo, P., Abrahams, V. M., Peng, B., Fill, S., Romero, R., i Mor, G. (2009). Activation of TLR3 in the trophoblast is associated with preterm delivery. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 61(3), 196–212. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00682.x>
 216. Kolomeets, N. S., Orlovskaya, D. D., Rachmanova, V. I., i Uranova, N. A. (2005). Ultrastructural alterations in hippocampal mossy fiber synapses in schizophrenia: A postmortem morphometric study. *Synapse*, 57(1), 47–55. <https://doi.org/10.1002/syn.20153>
 217. Konopaske, G. T., Lange, N., Coyle, J. T., i Benes, F. M. (2014). Prefrontal cortical dendritic spine pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *JAMA psychiatry*, 71(12), 1323–1331. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.1582>
 218. Korkmaz, B. (2011). Theory of Mind and Neurodevelopmental Disorders of Childhood. *Pediatric Research*, 69(8), 101–108. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318212c177>
 219. Koss, W. A., Belden, C. E., Hristov, A. D., i Juraska, J. M. (2014). Dendritic remodeling in the adolescent medial prefrontal cortex and the basolateral amygdala of male and female rats. *Synapse*, 68(2), 61–72. <https://doi.org/10.1002/syn.21716>
 220. Kovats, S. (2015). Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular Immunology*, 294(2), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.01.018>
 221. Labouesse, M. A., Dong, E., Grayson, D. R., Guidotti, A., i Meyer, U. (2015). Maternal immune activation induces GAD1 and GAD2 promoter remodeling in the offspring prefrontal cortex. *Epigenetics*, 10(12), 1143–1155. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1114202>
 222. Lafon-Cazal, M., Adjali, O., Galéotti, N., Poncet, J., Jouin, P., Homburger, V., Bockaert, J., i Marin, P. (2003). Proteomic Analysis of Astrocytic Secretion in the Mouse: Comparison with the cerebrospinal fluid proteome. *Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 24438–24448. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211980200>
 223. Laham, N., Brennecke, S. P., Bendtzen, K., i Rice, G. E. (1996). Differential release of interleukin-6 from human gestational tissues in association with labour and in vitro endotoxin treatment. *Journal of Endocrinology*, 149(3), 431–439. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1490431>
 224. Lanté, F., Meunier, J., Guiramand, J., De Jesus Ferreira, M.-C., Cambonie, G., Aimar, R., Cohen-Solal, C., Maurice, T., Vignes, M., i Barbanel, G. (2008). LateN-acetylcysteine treatment prevents the deficits induced in the offspring of dams

- exposed to an immune stress during gestation. *Hippocampus*, 18(6), 602–609. <https://doi.org/10.1002/hipo.20421>
225. Lanté, F., Meunier, J., Guiramand, J., Maurice, T., Cavalier, M., de Jesus Ferreira, M.-C., Aimar, R., Cohen-Solal, C., Vignes, M., i Barbanel, G. (2007). Neurodevelopmental damage after prenatal infection: Role of oxidative stress in the fetal brain. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(8), 1231–1245. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.027>
 226. LaSalle, J. M., i Yasui, D. H. (2009). Evolving Role of MeCP2 in Rett syndrome and Autism. *Epigenomics*, 1(1), 119–130. <https://doi.org/10.2217/epi.09.13>
 227. Lattke, M., Magnutzki, A., Walther, P., Wirth, T., i Baumann, B. (2012). Nuclear Factor κ B Activation Impairs Ependymal Ciliogenesis and Links Neuroinflammation to Hydrocephalus Formation. *The Journal of Neuroscience*, 32(34), 11511–11523. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0182-12.2012>
 228. Lee, S., Kim, J.-H., Kim, J.-H., Seo, J.-W., Han, H.-S., Lee, W.-H., Mori, K., Nakao, K., Barasch, J., i Suk, K. (2011). Lipocalin-2 Is a Chemokine Inducer in the Central Nervous System. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(51), 43855–43870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.299248>
 229. Lee, S., Lee, J., Kim, S., Park, J.-Y., Lee, W.-H., Mori, K., Kim, S.-H., Kim, I. K., i Suk, K. (2007). A dual role of lipocalin 2 in the apoptosis and deramification of activated microglia. *Journal of Immunology*, 179(5), 3231–3241. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.3231>
 230. Lee, S., Park, J.-Y., Lee, W.-H., Kim, H., Park, H.-C., Mori, K., i Suk, K. (2009). Lipocalin-2 Is an Autocrine Mediator of Reactive Astrocytosis. *The Journal of Neuroscience*, 29(1), 234–249. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5273-08.2009>
 231. Leekam, S. R., Prior, M. R., i Uljarevic, M. (2011). Restricted and repetitive behaviors in autism spectrum disorders: A review of research in the last decade. *Psychological Bulletin*, 137(4), 562–593. <https://doi.org/10.1037/a0023341>
 232. Li, J., Xu, P., Hong, Y., Xie, Y., Peng, M., Sun, R., Guo, H., Zhang, X., Zhu, W., Wang, J., i Liu, X. (2023). Lipocalin-2-mediated astrocyte pyroptosis promotes neuroinflammatory injury via NLRP3 inflammasome activation in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Journal of Neuroinflammation*, 20(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02819-5>
 233. Li, M., Cui, Z., Niu, Y., Liu, B., Fan, W., Yu, D., i Deng, J. (2010). Synaptogenesis in the developing mouse visual cortex. *Brain Research Bulletin*, 81(1), 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.08.028>
 234. Li, Q., i Barres, B. A. (2018). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(4), 225–242. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.125>
 235. Li, W.-Y., Chang, Y.-C., Lee, L. J.-H., i Lee, L.-J. (2014). Prenatal Infection Affects the Neuronal Architecture and Cognitive Function in Adult Mice. *Developmental Neuroscience*, 36(5), 359–370. <https://doi.org/10.1159/000362383>
 236. Li, Y., Shen, M., Stockton, M. E., i Zhao, X. (2019). Hippocampal deficits in neurodevelopmental disorders. *Neurobiology of learning and memory*, 165, 106945. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.10.001>
 237. Lin, Q., Huang, E., Fan, K., Zhang, Z., Shangguan, H., Zhang, W., Fang, W., Ou, Q., i Liu, X. (2024). Cerebrospinal Fluid Neutrophil Gelatinase-Associated

- Lipocalin as a Novel Biomarker for Postneurosurgical Bacterial Meningitis: A Prospective Observational Cohort Study. *Neurosurgery*, 95(6), 1418. <https://doi.org/10.1227/neu.0000000000003021>
238. Lin, Y.-L., i Wang, S. (2014). Prenatal lipopolysaccharide exposure increases depression-like behaviors and reduces hippocampal neurogenesis in adult rats. *Behavioural Brain Research*, 259, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.034>
 239. Lipina, T. V., Haque, F. N., McGirr, A., Boutros, P. C., Berger, T., Mak, T. W., Roder, J. C., i Wong, A. H. C. (2012). Prophylactic Valproic Acid Treatment Prevents Schizophrenia-Related Behaviour in Disc1-L100P Mutant Mice. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051562>
 240. Lipina, T. V., Zai, C., Hlousek, D., Roder, J. C., i Wong, A. H. C. (2013). Maternal immune activation during gestation interacts with Disc1 point mutation to exacerbate schizophrenia-related behaviors in mice. *The Journal of Neuroscience*, 33(18), 7654–7666. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0091-13.2013>
 241. Liu, Q., i Nilsen-Hamilton, M. (1995). Identification of a New Acute Phase Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 270(38), 22565–22570. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.38.22565>
 242. Liu, R., Wang, J., Chen, Y., Collier, J. M., Capuk, O., Jin, S., Sun, M., Mondal, S. K., Whiteside, T. L., Stolz, D. B., Yang, Y., i Begum, G. (2022). NOX activation in reactive astrocytes regulates astrocytic LCN2 expression and neurodegeneration. *Cell Death & Disease*, 13(4), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04831-8>
 243. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., i Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
 244. Liu, Y.-F., Li, M.-Y., Yan, Y.-P., Wei, W., Li, B., Pan, H.-Y., Yang, Z.-M., i Liang, X.-H. (2020). ER α -dependent stimulation of LCN2 in uterine epithelium during mouse early pregnancy. *Reproduction*, 159(4), 493–501. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0616>
 245. Liu, Z., Reba, S., Chen, W.-D., Porwal, S. K., Boom, W. H., Petersen, R. B., Rojas, R., Viswanathan, R., i Devireddy, L. (2014). Regulation of mammalian siderophore 2,5-DHBA in the innate immune response to infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(6), 1197–1213. <https://doi.org/10.1084/jem.20132629>
 246. Lozoff, B., i Georgieff, M. K. (2006). Iron Deficiency and Brain Development. *Seminars in Pediatric Neurology*, 13(3), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2006.08.004>
 247. Lu, D., He, L., Xiang, W., Ai, W.-M., Cao, Y., Wang, X.-S., Pan, A., Luo, X.-G., Li, Z., i Yan, X.-X. (2013). Somal and Dendritic Development of Human CA3 Pyramidal Neurons From Midgestation to Middle Childhood: A Quantitative Golgi Study. *The Anatomical Record*, 296(1), 123–132. <https://doi.org/10.1002/ar.22616>
 248. Luan, W., Hammond, L. A., Vuillermot, S., Meyer, U., i Eyles, D. W. (2018). Maternal Vitamin D Prevents Abnormal Dopaminergic Development and Function in a Mouse Model of Prenatal Immune Activation. *Scientific Reports*, 8(1), 9741. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28090-w>

249. Luoni, A., Richetto, J., Longo, L., i Riva, M. A. (2017). Chronic lurasidone treatment normalizes GABAergic marker alterations in the dorsal hippocampus of mice exposed to prenatal immune activation. *European Neuropsychopharmacology*, 27(2), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.12.001>
250. MacDowell, K. S., Munarriz-Cuezva, E., Caso, J. R., Madrigal, J. L. M., Zabala, A., Meana, J. J., García-Bueno, B., i Leza, J. C. (2017). Paliperidone reverts Toll-like receptor 3 signaling pathway activation and cognitive deficits in a maternal immune activation mouse model of schizophrenia. *Neuropharmacology*, 116, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.12.025>
251. Machado, C. J., Whitaker, A. M., Smith, S. E. P., Patterson, P. H., i Bauman, M. D. (2015). Maternal Immune Activation in Nonhuman Primates Alters Social Attention in Juvenile Offspring. *Biological psychiatry*, 77(9), 823–832. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.07.035>
252. Malkova, N. V., Yu, C. Z., Hsiao, E. Y., Moore, M. J., i Patterson, P. H. (2012). Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(4), 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.01.011>
253. Marques, F., Rodrigues, A.-J., Sousa, J. C., Coppola, G., Geschwind, D. H., Sousa, N., Correia-Neves, M., i Palha, J. A. (2008). Lipocalin 2 is a Choroid Plexus Acute-Phase Protein. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28(3), 450–455. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600557>
254. Masi, A., Quintana, D. S., Glozier, N., Lloyd, A. R., Hickie, I. B., i Guastella, A. J. (2015). Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 20(4), 440–446. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.59>
255. Matsumoto, M., i Seya, T. (2008). TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(7), 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.11.005>
256. Matsuura, A., Ishima, T., Fujita, Y., Iwayama, Y., Hasegawa, S., Kawahara-Miki, R., Maekawa, M., Toyoshima, M., Ushida, Y., Suganuma, H., Kida, S., Yoshikawa, T., Iyo, M., i Hashimoto, K. (2018). Dietary glucoraphanin prevents the onset of psychosis in the adult offspring after maternal immune activation. *Scientific Reports*, 8(1), 2158. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20538-3>
257. Mattei, D., Djodari-Irani, A., Hadar, R., Pelz, A., de Cossío, L. F., Goetz, T., Matyash, M., Kettenmann, H., Winter, C., i Wolf, S. A. (2014). Minocycline rescues decrease in neurogenesis, increase in microglia cytokines and deficits in sensorimotor gating in an animal model of schizophrenia. *Brain, Behavior, and Immunity*, 38, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.01.019>
258. Mattei, D., Ivanov, A., Ferrai, C., Jordan, P., Guneykaya, D., Buonfiglioli, A., Schaafsma, W., Przanowski, P., Deuther-Conrad, W., Brust, P., Hesse, S., Patt, M., Sabri, O., Ross, T. L., Eggen, B. J. L., Boddeke, E. W. G. M., Kaminska, B., Beule, D., Pombo, A., ... Wolf, S. A. (2017). Maternal immune activation results in complex microglial transcriptome signature in the adult offspring that is reversed by minocycline treatment. *Translational Psychiatry*, 7(5), e1120. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.80>

259. Mavroudis, I. A., Petrides, F., Manani, M., Chatzinikolaou, F., Ciobică, A. S., Pădurariu, M., Kazis, D., Njau, S. N., Costa, V. G., i Baloyannis, S. J. (2017). Purkinje cells pathology in schizophrenia. A morphometric approach. *Rom J Morphol Embryol*, 58(2), 419–424.
260. Meyer, U., Feldon, J., i Fatemi, S. H. (2009). In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(7), 1061–1079. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.05.001>
261. Meyer, U., Nyffeler, M., Engler, A., Urwyler, A., Schedlowski, M., Knuesel, I., Yee, B. K., i Feldon, J. (2006). The Time of Prenatal Immune Challenge Determines the Specificity of Inflammation-Mediated Brain and Behavioral Pathology. *The Journal of Neuroscience*, 26(18), 4752–4762. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0099-06.2006>
262. Meyer, U., Nyffeler, M., Yee, B. K., Knuesel, I., i Feldon, J. (2008). Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(4), 469–486. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.09.012>
263. Miharada, K.-I., Hiroshima, T., Sudo, K., Nagasawa, T., i Nakamura, Y. (2005). Lipocalin 2 functions as a negative regulator of red blood cell production in an autocrine fashion. *The FASEB Journal*, 19(13), 1881–1883. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3809fje>
264. Mishra, J., Ma, Q., Prada, A., Mitsnefes, M., Zahedi, K., Yang, J., Barasch, J., i Devarajan, P. (2003). Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(10), 2534–2543. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000088027.54400.c6>
265. Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A. W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, A. J., Yoshimura, Y., i Nabekura, J. (2016). Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12540>
266. Mondal, A., Bose, D., Saha, P., Sarkar, S., Seth, R., Kimono, D., Albadrani, M., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P., i Chatterjee, S. (2020). Lipocalin 2 induces neuroinflammation and blood-brain barrier dysfunction through liver-brain axis in murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 201. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01876-4>
267. Monier, A., H, A.-B., Al, D., P, E., P, G., i C, V. (2007). Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(5). <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3180517b46>
268. Monteiro, P., i Feng, G. (2017). SHANK proteins: Roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(3), 147–157. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.183>
269. Morais, L. H., Schreiber, H. L., i Mazmanian, S. K. (2021). The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature Reviews Microbiology*, 19(4), 241–255. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>
270. Morgan, J. T., Chana, G., Abramson, I., Semendeferi, K., Courchesne, E., i Overall, I. P. (2012). Abnormal microglial-neuronal spatial organization in the

- dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Brain Research*, 1456, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.036>
271. Morgan, J. T., Chana, G., Pardo, C. A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Courchesne, E., i Everall, I. P. (2010). Microglial Activation and Increased Microglial Density Observed in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Autism. *Biological Psychiatry*, 68(4), 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.024>
 272. Morris, C. S., i Esiri, M. M. (1998). The expression of cytokines and their receptors in normal and mildly reactive human brain. *Journal of Neuroimmunology*, 92(1–2), 85–97. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00181-7](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00181-7)
 273. Moscovitz, A. E., Asif, H., Lindenmaier, L. B., Calzadilla, A., Zhang, C., i Mirsaeidi, M. (2019). The Importance of Melanocortin Receptors and Their Agonists in Pulmonary Disease. *Frontiers in Medicine*, 6, 145. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00145>
 274. Mosialou, I., Shikhel, S., Liu, J.-M., Maurizi, A., Luo, N., He, Z., Huang, Y., Zong, H., Friedman, R. A., Barasch, J., Lanzano, P., Deng, L., Leibel, R. L., Rubin, M., Nickolas, T., Chung, W., Zeltser, L. M., Williams, K. W., Pessin, J. E., i Kousteni, S. (2017). MC4R-dependent suppression of appetite by bone-derived lipocalin 2. *Nature*, 543(7645), 385–390. <https://doi.org/10.1038/nature21697>
 275. Mucha, M., Skrzypiec, A. E., Schiavon, E., Attwood, B. K., Kucerova, E., i Pawlak, R. (2011). Lipocalin-2 controls neuronal excitability and anxiety by regulating dendritic spine formation and maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(45), 18436–18441. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107936108>
 276. Munarriz-Cuezva, E., i Meana, J. J. (2024). Poly (I:C)-induced maternal immune activation generates impairment of reversal learning performance in offspring. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.16212>
 277. Nam, Y., Kim, J.-H., Seo, M., Kim, J.-H., Jin, M., Jeon, S., Seo, J., Lee, W.-H., Bing, S. J., Jee, Y., Lee, W. K., Park, D. H., Kook, H., i Suk, K. (2014). Lipocalin-2 protein deficiency ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis: The pathogenic role of lipocalin-2 in the central nervous system and peripheral lymphoid tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(24), 16773–16789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.542282>
 278. Naudé, P. J. W., Eisel, U. L. M., Comijs, H. C., Groenewold, N. A., De Deyn, P. P., Bosker, F. J., Luiten, P. G. M., den Boer, J. A., i Oude Voshaar, R. C. (2013). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A novel inflammatory marker associated with late-life depression. *Journal of Psychosomatic Research*, 75(5), 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2013.08.023>
 279. Naudé, P. J. W., Nyakas, C., Eiden, L. E., Ait-Ali, D., van der Heide, R., Engelborghs, S., Luiten, P. G. M., De Deyn, P. P., den Boer, J. A., i Eisel, U. L. M. (2012). Lipocalin 2: Novel component of proinflammatory signaling in Alzheimer's disease. *FASEB Journal*, 26(7), 2811–2823. <https://doi.org/10.1096/fj.11-202457>
 280. Naviaux, R. K., Zolkipli, Z., Wang, L., Nakayama, T., Naviaux, J. C., Le, T. P., Schuchbauer, M. A., Rogac, M., Tang, Q., Dugan, L. L., i Powell, S. B. (2013). Antipurinergic therapy corrects the autism-like features in the poly(IC) mouse model. *PloS One*, 8(3), e57380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057380>

281. Nijmeijer, J. S., Minderaa, R. B., Buitelaar, J. K., Mulligan, A., Hartman, C. A., i Hoekstra, P. J. (2008). Attention-deficit/hyperactivity disorder and social dysfunctioning. *Clinical Psychology Review*, 28(4), 692–708. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2007.10.003>
282. Nimchinsky, E. A., Oberlander, A. M., i Svoboda, K. (2001). Abnormal Development of Dendritic Spines in FMR1 Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience*, 21(14), 5139–5146. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-14-05139.2001>
283. Ning, H., Wang, H., Zhao, L., Zhang, C., Li, X.-Y., Chen, Y.-H., i Xu, D.-X. (2008). Maternally-administered lipopolysaccharide (LPS) increases tumor necrosis factor alpha in fetal liver and fetal brain: Its suppression by low-dose LPS pretreatment. *Toxicology Letters*, 176(1), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.08.002>
284. Nishida, H., i Okabe, S. (2007). Direct Astrocytic Contacts Regulate Local Maturation of Dendritic Spines. *Journal of Neuroscience*, 27(2), 331–340. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4466-06.2007>
285. Nouel, D., Burt, M., Zhang, Y., Harvey, L., i Boksa, P. (2012). Prenatal exposure to bacterial endotoxin reduces the number of GAD67- and reelin-immunoreactive neurons in the hippocampus of rat offspring. *European Neuropsychopharmacology*, 22(4), 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.08.001>
286. Oh-Nishi, A., Obayashi, S., Sugihara, I., Minamimoto, T., i Suhara, T. (2010). Maternal immune activation by polyriboinosinic-polyribocytidilic acid injection produces synaptic dysfunction but not neuronal loss in the hippocampus of juvenile rat offspring. *Brain Research*, 1363, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.054>
287. Olson, B., Zhu, X., Norgard, M. A., Diba, P., Levasseur, P. R., Buenafe, A. C., Huisman, C., Burfeind, K. G., Michaelis, K. A., Kong, G., Braun, T., i Marks, D. L. (2021). Chronic cerebral lipocalin 2 exposure elicits hippocampal neuronal dysfunction and cognitive impairment. *Brain, Behavior, and Immunity*, 97, 102–118. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.07.002>
288. Olson, B., Zhu, X., Norgard, M. A., Levasseur, P. R., Butler, J. T., Buenafe, A., Burfeind, K. G., Michaelis, K. A., Pelz, K. R., Mendez, H., Edwards, J., Krasnow, S. M., Grossberg, A. J., i Marks, D. L. (2021). Lipocalin 2 mediates appetite suppression during pancreatic cancer cachexia. *Nature Communications*, 12(1), 2057. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22361-3>
289. O’Rahilly, R., i Gardner, E. (2008). The initial development of the human brain. *Acta Anatomica*, 104(2), 123–133. <https://doi.org/10.1159/000145061>
290. O’Rahilly, R., i Müller, F. (2007). The development of the neural crest in the human. *Journal of Anatomy*, 211(3), 335–351. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00773.x>
291. Orner, D. A., Chen, C.-C., Orner, D. E., i Brumberg, J. C. (2014). Alterations of dendritic protrusions over the first postnatal year of a mouse: An analysis in layer VI of the barrel cortex. *Brain Structure & Function*, 219(5), 1709–1720. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0596-5>
292. O’Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., Levy, R., Ko, A., Lee, C., Smith, J. D., Turner, E. H., Stanaway, I. B., Vernot, B., Malig, M.,

- Baker, C., Reilly, B., Akey, J. M., Borenstein, E., Rieder, M. J., ... Eichler, E. E. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, 485(7397), 246–250. <https://doi.org/10.1038/nature10989>
293. Oskvig, D. B., Elkahoul, A. G., Johnson, K. R., Phillips, T. M., i Herkenham, M. (2012). Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(4), 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.01.015>
294. Paolicelli, R. C., i Ferretti, M. T. (2017). Function and Dysfunction of Microglia during Brain Development: Consequences for Synapses and Neural Circuits. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 9, 9. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2017.00009>
295. Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., Takano, H., Moss, S. J., McCarthy, K., i Haydon, P. G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*, 310(5745), 113–116. <https://doi.org/10.1126/science.1116916>
296. Patrich, E., Piontkewitz, Y., Peretz, A., Weiner, I., i Attali, B. (2016). Maternal immune activation produces neonatal excitability defects in offspring hippocampal neurons from pregnant rats treated with poly I:C. *Scientific Reports*, 6, 19106. <https://doi.org/10.1038/srep19106>
297. Patrich, E., Piontkewitz, Y., Peretz, A., Weiner, I., i Attali, B. (2016). Maturation- and sex-sensitive depression of hippocampal excitatory transmission in a rat schizophrenia model. *Brain, Behavior, and Immunity*, 51, 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.021>
298. Paylor, J. W., Lins, B. R., Greba, Q., Moen, N., de Moraes, R. S., Howland, J. G., i Winship, I. R. (2016). Developmental disruption of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex after maternal immune activation. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep37580>
299. Pekala, M., Doliwa, M., i Kalita, K. (2021). Impact of maternal immune activation on dendritic spine development. *Developmental Neurobiology*, 81(5), 524–545. <https://doi.org/10.1002/dneu.22804>
300. Pendyala, G., Chou, S., Jung, Y., Coiro, P., Spartz, E., Padmashri, R., Li, M., i Dunaevsky, A. (2017). Maternal Immune Activation Causes Behavioral Impairments and Altered Cerebellar Cytokine and Synaptic Protein Expression. *Neuropsychopharmacology*, 42(7), 1435–1446. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.7>
301. Persico, A. M., i Napolioni, V. (2013). Autism genetics. *Behavioural Brain Research*, 251, 95–112. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.06.012>
302. Petanjek, Z., Judaš, M., Šimić, G., Rašin, M. R., Uylings, H. B. M., Rakic, P., i Kostović, I. (2011). Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32), 13281–13286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105108108>
303. Petit, T. L., Leboutillier, J. C., Gregorio, A., i Libstug, H. (1988). The pattern of dendritic development in the cerebral cortex of the rat. *Developmental Brain Research*, 41(1–2), 209–219. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(88\)90183-6](https://doi.org/10.1016/0165-3806(88)90183-6)

304. Petropoulou, P.-I., Mosialou, I., Shikhel, S., Hao, L., Panitsas, K., Bisikirska, B., Luo, N., Bahna, F., Kim, J., Carberry, P., Zanderigo, F., Simpson, N., Bakalian, M., Kassir, S., Shapiro, L., Underwood, M. D., May, C. M., Soligapuram Sai, K. K., Jorgensen, M. J., ... Kousteni, S. (2020). Lipocalin-2 is an anorexigenic signal in primates. *eLife*, 9, e58949. <https://doi.org/10.7554/eLife.58949>
305. Pinares-Garcia, P., Stratikopoulos, M., Zagato, A., Loke, H., i Lee, J. (2018). Sex: A Significant Risk Factor for Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *Brain Sciences*, 8(8), 154. <https://doi.org/10.3390/brainsci8080154>
306. Piontkewitz, Y., Arad, M., i Weiner, I. (2011). Risperidone administered during asymptomatic period of adolescence prevents the emergence of brain structural pathology and behavioral abnormalities in an animal model of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 37(6), 1257–1269. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbq040>
307. Pizzagalli, M. D., Bensimon, A., i Superti-Furga, G. (2021). A guide to plasma membrane solute carrier proteins. *The Febs Journal*, 288(9), 2784–2835. <https://doi.org/10.1111/febs.15531>
308. Platanaki, C., Paraskevas, T., Delastic, A.-L., Michailides, C., Kantanis, A., Polychronopoulos, P., Marangos, M., i Velissaris, D. (2023). The role of cerebrospinal fluid levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and electroencephalography in the assessment of impaired consciousness in the context of infection. *Romanian Journal of Internal Medicine*, 61(2), 112–115. <https://doi.org/10.2478/rjim-2023-0005>
309. Polyak, A., Rosenfeld, J. A., i Girirajan, S. (2015). An assessment of sex bias in neurodevelopmental disorders. *Genome Medicine*, 7(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0216-5>
310. Pont-Lezica, L., Beumer, W., Colasse, S., Drexhage, H., Versnel, M., i Bessis, A. (2014). Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: Functional impact of prenatal inflammation. *The European Journal of Neuroscience*, 39(10), 1551–1557. <https://doi.org/10.1111/ejn.12508>
311. Pratt, L., Ni, L., Ponzio, N. M., i Jonakait, G. M. (2013). Maternal inflammation promotes fetal microglial activation and increased cholinergic expression in the fetal basal forebrain: Role of interleukin-6. *Pediatric Research*, 74(4), 393–401. <https://doi.org/10.1038/pr.2013.126>
312. Puścian, A., Łęski, S., Kasprówsz, G., Winiarski, M., Borowska, J., Nikolaev, T., Boguszewski, P. M., Lipp, H.-P., i Knapska, E. (2016). Eco-HAB as a fully automated and ecologically relevant assessment of social impairments in mouse models of autism. *eLife*, 5, e19532. <https://doi.org/10.7554/eLife.19532>
313. Puścian, A., Winiarski, M., Borowska, J., Łęski, S., Górkiewicz, T., Chaturvedi, M., Nowicka, K., Wołyniak, M., Chmielewska, J. J., Nikolaev, T., Meyza, K., Dziembowska, M., Kaczmarek, L., i Knapska, E. (2022). Targeted therapy of cognitive deficits in fragile X syndrome. *Molecular Psychiatry*, 27(6), 2766–2776. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01527-5>
314. Quagliato, L. A., de Matos, U., i Nardi, A. E. (2021). Maternal immune activation generates anxiety in offspring: A translational meta-analysis. *Translational Psychiatry*, 11(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01361-3>
315. Quenneville, A. F., Kalogeropoulou, E., Nicastro, R., Weibel, S., Chanut, F., i Perroud, N. (2022). Anxiety disorders in adult ADHD: A frequent comorbidity and

- a risk factor for externalizing problems. *Psychiatry Research*, 310, 114423. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2022.114423>
316. Radewicz, K., Garey, L. J., Gentleman, S. M., i Reynolds, R. (2000). Increase in HLA-DR Immunoreactive Microglia in Frontal and Temporal Cortex of Chronic Schizophrenics. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 59(2), 137–150. <https://doi.org/10.1093/jnen/59.2.137>
 317. Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y., i Jacobson, M. D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science*, 262(5134), 695–700. <https://doi.org/10.1126/science.8235590>
 318. Rapoport, J., Giedd, J., i Gogtay, N. (2012). Neurodevelopmental model of schizophrenia: Update 2012. *Molecular psychiatry*, 17(12), 1228–1238. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.23>
 319. Rathore, K. I., Berard, J. L., Redensek, A., Chierzi, S., Lopez-Vales, R., Santos, M., Akira, S., i David, S. (2011). Lipocalin 2 Plays an Immunomodulatory Role and Has Detrimental Effects after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience*, 31(38), 13412–13419. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0116-11.2011>
 320. Ray, A., Redhead, K., Selkirk, S., i Poole, S. (1991). Variability in LPS composition, antigenicity and reactogenicity of phase variants of Bordetella pertussis. *FEMS Microbiology Letters*, 63(2–3), 211–217. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(91\)90088-r](https://doi.org/10.1016/0378-1097(91)90088-r)
 321. Rees, W. D., i Hay, S. M. (2014). Lipocalin-2 (Lcn2) expression is mediated by maternal nutrition during the development of the fetal liver. *Genes & Nutrition*, 9(1), 380. <https://doi.org/10.1007/s12263-013-0380-4>
 322. Reisinger, S. N., Kong, E., Khan, D., Schulz, S., Ronovsky, M., Berger, S., Horvath, O., Cabatic, M., Berger, A., i Pollak, D. D. (2016). Maternal immune activation epigenetically regulates hippocampal serotonin transporter levels. *Neurobiology of Stress*, 4, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.02.007>
 323. Rexrode, L. E., Hartley, J., Showmaker, K. C., Challagundla, L., Vandewege, M. W., Martin, B. E., Blair, E., Bollavarapu, R., Antonyraj, R. B., Hilton, K., Gardiner, A., Valeri, J., Gisabella, B., Garrett, M. R., Theoharides, T. C., i Pantazopoulos, H. (2024). Molecular profiling of the hippocampus of children with autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, 29(7), 1968–1979. <https://doi.org/10.1038/s41380-024-02441-8>
 324. Richetto, J., Calabrese, F., Riva, M. A., i Meyer, U. (2014). Prenatal immune activation induces maturation-dependent alterations in the prefrontal GABAergic transcriptome. *Schizophrenia Bulletin*, 40(2), 351–361. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs195>
 325. Robbins, J. R., i Bakardjiev, A. I. (2012). Pathogens and the Placental Fortress. *Current Opinion in Microbiology*, 15(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.006>
 326. Roberts, R. C., Roche, J. K., i Conley, R. R. (2005). Synaptic differences in the patch matrix compartments of subjects with schizophrenia: A postmortem ultrastructural study of the striatum. *Neurobiology of Disease*, 20(2), 324–335. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.03.015>
 327. Roberts, R. C., Roche, J. K., i Conley, R. R. (2005). Synaptic differences in the postmortem striatum of subjects with schizophrenia: A stereological

- ultrastructural analysis. *Synapse*, 56(4), 185–197. <https://doi.org/10.1002/syn.20144>
328. Roessmann, U., i Gambetti, P. (1986). Astrocytes in the developing human brain: An immunohistochemical study. *Acta Neuropathologica*, 70(3–4), 308–313. <https://doi.org/10.1007/BF00686089>
 329. Romejko, K., Markowska, M., i Niemczyk, S. (2023). The Review of Current Knowledge on Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10470. <https://doi.org/10.3390/ijms241310470>
 330. Romero, E., Ali, C., Molina-Holgado, E., Castellano, B., Guaza, C., i Borrell, J. (2007). Neurobehavioral and Immunological Consequences of Prenatal Immune Activation in Rats. Influence of Antipsychotics. *Neuropsychopharmacology*, 32(8), 1791–1804. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301292>
 331. Romero, R., Lafreniere, D., Duff, G. W., Kadar, N., Durum, S., i Hobbins, J. C. (1987). Failure of endotoxin to cross the chorioamniotic membranes in vitro. *American Journal of Perinatology*, 4(4), 360–362. <https://doi.org/10.1055/s-2007-999808>
 332. Rosoklija, G., Toomayan, G., Ellis, S. P., Keilp, J., Mann, J. J., Latov, N., Hays, A. P., i Dwork, A. J. (2000). Structural Abnormalities of Subicular Dendrites in Subjects With Schizophrenia and Mood Disorders: Preliminary Findings. *Archives of General Psychiatry*, 57(4), 349–356. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.4.349>
 333. Ross, R. A., Kim, A., Das, P., Li, Y., Choi, Y. K., Thompson, A. T., Douglas, E., Subramanian, S., Ramos, K., Callahan, K., Bolshakov, V. Y., i Ressler, K. J. (2023). Prefrontal cortex melanocortin 4 receptors (MC4R) mediate food intake behavior in male mice. *Physiology & Behavior*, 269, 114280. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2023.114280>
 334. Roszkowska, M., Krysiak, A., Majchrowicz, L., Nader, K., Beroun, A., Michaluk, P., Pekala, M., Jaworski, J., Kondrakiewicz, L., Puścian, A., Knapska, E., Kaczmarek, L., i Kalita, K. (2022). SRF depletion in early life contributes to social interaction deficits in the adulthood. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(5), 278. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04291-5>
 335. Rousset, C. I., Chalon, S., Cantagrel, S., Bodard, S., Andres, C., Gressens, P., i Saliba, E. (2006). Maternal Exposure to LPS Induces Hypomyelination in the Internal Capsule and Programmed Cell Death in the Deep Gray Matter in Newborn Rats. *Pediatric Research*, 59(3), 428–433. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000199905.08848.55>
 336. Rudelli, R. D., Brown, W. T., Wisniewski, K., Jenkins, E. C., Laure-Kamionowska, M., Connell, F., i Wisniewski, H. M. (1985). Adult fragile X syndrome: Clinico-neuropathologic findings. *Acta Neuropathologica*, 67(3–4), 289–295. <https://doi.org/10.1007/BF00687814>
 337. Ruszczycki, B., Szepesi, Z., Wilczynski, G. M., Bijata, M., Kalita, K., Kaczmarek, L., i Wlodarczyk, J. (2012). Sampling issues in quantitative analysis of dendritic spines morphology. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 213. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-213>
 338. Saatci, D., van Nieuwenhuizen, A., i Handunnetthi, L. (2021). Maternal infection in gestation increases the risk of non-affective psychosis in offspring: A

- meta-analysis. *Journal of Psychiatric Research*, 139, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2021.05.039>
339. Salia, S., Burke, F. F., Hinks, M. E., Randell, A. M., Matheson, M. A., Walling, S. G., i Swift-Gallant, A. (2025). Gut microbiota transfer from the preclinical maternal immune activation model of autism is sufficient to induce sex-specific alterations in immune response and behavioural outcomes. *Brain, Behavior, and Immunity*, 123, 813–823. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2024.10.030>
 340. Samuelsson, A.-M., Jennische, E., Hansson, H.-A., i Holmäng, A. (2006). Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABAA dysregulation and impaired spatial learning. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(5), R1345–R1356. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00268.2005>
 341. Savla, G. N., Vella, L., Armstrong, C. C., Penn, D. L., i Twamley, E. W. (2013). Deficits in domains of social cognition in schizophrenia: A meta-analysis of the empirical evidence. *Schizophrenia Bulletin*, 39(5), 979–992. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs080>
 342. Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., i Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, 74(4), 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
 343. Schröder, S. K., Gasterich, N., Weiskirchen, S., i Weiskirchen, R. (2023). Lipocalin 2 receptors: Facts, fictions, and myths. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1229885>
 344. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., i Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in neurobiology*, 0, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>
 345. Serrano, M. E., Kim, E., Petrinovic, M. M., Turkheimer, F., i Cash, D. (2022). Imaging Synaptic Density: The Next Holy Grail of Neuroscience? *Frontiers in Neuroscience*, 16, 796129. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.796129>
 346. Shi, L., Smith, S. E. P., Malkova, N., Tse, D., Su, Y., i Patterson, P. H. (2009). Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.07.012>
 347. Shin, H. J., Jeong, E. A., Lee, J. Y., An, H. S., Jang, H. M., Ahn, Y. J., Lee, J., Kim, K. E., i Roh, G. S. (2021). Lipocalin-2 Deficiency Reduces Oxidative Stress and Neuroinflammation and Results in Attenuation of Kainic Acid-Induced Hippocampal Cell Death. *Antioxidants*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/antiox10010100>
 348. Shin Yim, Y., Park, A., Berrios, J., Lafourcade, M., Pascual, L. M., Soares, N., Yeon Kim, J., Kim, S., Kim, H., Waisman, A., Littman, D. R., Wickersham, I. R., Harnett, M. T., Huh, J. R., i Choi, G. B. (2017). Reversing behavioural abnormalities in mice exposed to maternal inflammation. *Nature*, 549(7673), 482–487. <https://doi.org/10.1038/nature23909>
 349. Short, S. J., Lubach, G. R., Karasin, A. I., Olsen, C. W., Styner, M., Knickmeyer, R. C., Gilmore, J. H., i Coe, C. L. (2010). Maternal influenza infection during

- pregnancy impacts postnatal brain development in the rhesus monkey. *Biological Psychiatry*, 67(10), 965–973. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.11.026>
350. Silbereis, J. C., Pochareddy, S., Zhu, Y., Li, M., i Sestan, N. (2016). The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron*, 89(2), 248–268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.008>
 351. Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C., i Crawley, J. N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(7), 490–502. <https://doi.org/10.1038/nrn2851>
 352. Simpson, K. L., Keelan, J. A., i Mitchell, M. D. (1998). Labor-Associated Changes in Interleukin-10 Production and Its Regulation by Immunomodulators in Human Choriondecidua. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(12), 4332–4337. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.12.5335>
 353. Skrzypiec, A. E., Shah, R. S., Schiavon, E., Baker, E., Skene, N., Pawlak, R., i Mucha, M. (2013). Stress-induced lipocalin-2 controls dendritic spine formation and neuronal activity in the amygdala. *PloS One*, 8(4), e61046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061046>
 354. Smith, M. R., Glicksberg, B. S., Li, L., Chen, R., Morishita, H., i Dudley, J. T. (2017). Loss-of-function of neuroplasticity-related genes confers risk for human neurodevelopmental disorders. PACIFIC SYMPOSIUM ON BIOCOMPUTING 2018: Proceedings of the Pacific Symposium, 68–79. https://doi.org/10.1142/9789813235533_0007
 355. Smith, S. E. P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., i Patterson, P. H. (2007). Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. *The Journal of Neuroscience*, 27(40), 10695–10702. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007>
 356. Sofroniew, M. V. (2015). Astrogliosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020420>
 357. Sulek, C. M., Farooqi, N., Verly, M., Lim, T. K., i Ruthazer, E. S. (2018). Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Developmental Dynamics*, 247(4), 588–619. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24612>
 358. Soni, S. S., Cruz, D., Bobek, I., Chionh, C. Y., Nalesso, F., Lentini, P., de Cal, M., Corradi, V., Virzi, G., i Ronco, C. (2010). NGAL: A biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *International Urology and Nephrology*, 42(1), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s11255-009-9608-z>
 359. Soumiya, H., Fukumitsu, H., i Furukawa, S. (2011). Prenatal immune challenge compromises development of upper-layer but not deeper-layer neurons of the mouse cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Research*, 89(9), 1342–1350. <https://doi.org/10.1002/jnr.22636>
 360. Spacek, J. (1985). Three-dimensional analysis of dendritic spines. III. Glial sheath. *Anatomy and Embryology*, 171(2), 245–252. <https://doi.org/10.1007/BF00341419>
 361. Spacek, J., i Harris, K. M. (1998). Three-dimensional organization of cell adhesion junctions at synapses and dendritic spines in area CA1 of the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 393(1), 58–68. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980330\)393:1<58::AID-CNE6>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980330)393:1<58::AID-CNE6>3.0.CO;2-P)

362. Spuch, C., Ortolano, S., i Navarro, C. (2012). LRP-1 and LRP-2 receptors function in the membrane neuron. Trafficking mechanisms and proteolytic processing in Alzheimer's disease. *Frontiers in Physiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00269>
363. Squarzoni, P., Oller, G., Hoeffel, G., Pont-Lezica, L., Rostaing, P., Low, D., Bessis, A., Ginhoux, F., i Garel, S. (2014). Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. *Cell Reports*, 8(5), 1271–1279. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.042>
364. Stellwagen, D., i Malenka, R. C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*, 440(7087), 1054–1059. <https://doi.org/10.1038/nature04671>
365. Stoner, R., Chow, M. L., Boyle, M. P., Sunkin, S. M., Mouton, P. R., Roy, S., Wynshaw-Boris, A., Colamarino, S. A., Lein, E. S., i Courchesne, E. (2014). Patches of disorganization in the neocortex of children with autism. *The New England Journal of Medicine*, 370(13), 1209–1219. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1307491>
366. Südhof, T. C. (2008). Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, 455(7215), 903–911. <https://doi.org/10.1038/nature07456>
367. Sunil, V. R., Patel, K. J., Nilsen-Hamilton, M., Heck, D. E., Laskin, J. D., i Laskin, D. L. (2007). Acute endotoxemia is associated with upregulation of lipocalin 24p3/Lcn2 in lung and liver. *Experimental and molecular pathology*, 83(2), 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2007.03.004>
368. Supekar, K., Uddin, L. Q., Khouzam, A., Phillips, J., Gaillard, W. D., Kenworthy, L. E., Yerys, B. E., Vaidya, C. J., i Menon, V. (2013). Brain hyperconnectivity in children with autism and its links to social deficits. *Cell Reports*, 5(3), 738–747. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.001>
369. Szewczyk, L. M., Lipiec, M. A., Liszewska, E., Meyza, K., Urban-Ciecko, J., Kondrakiewicz, L., Goncerzewicz, A., Rafalko, K., Krawczyk, T. G., Bogaj, K., Vainchtein, I. D., Nakao-Inoue, H., Puscian, A., Knapska, E., Sanders, S. J., Jan Nowakowski, T., Molofsky, A. V., i Wisniewska, M. B. (2024). Astrocytic β -catenin signaling via TCF7L2 regulates synapse development and social behavior. *Molecular Psychiatry*, 29(1), 57–73. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02281-y>
370. Światowa Organizacja Zdrowia. (2019). *International classification of diseases for mortality and morbidity statistics (11th ed.)*. <https://icd.who.int/en>
371. Światowa Organizacja Zdrowia. (2024). *Clinical Descriptions and Diagnostic Requirements for ICD-11 Mental, Behavioural and Neurodevelopmental Disorders* (1st ed). World Health Organization.
372. Tan, Y., Fujita, Y., Pu, Y., Chang, L., Qu, Y., Wang, X., i Hashimoto, K. (2022). Repeated intermittent administration of (R)-ketamine during juvenile and adolescent stages prevents schizophrenia-relevant phenotypes in adult offspring after maternal immune activation: A role of TrkB signaling. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 272(4), 693–701. <https://doi.org/10.1007/s00406-021-01365-6>
373. Tang, B., Jia, H., Kast, R. J., i Thomas, E. A. (2013). Epigenetic changes at gene promoters in response to immune activation in utero. *Brain, Behavior, and Immunity*, 30, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.01.086>

374. Tang, G., Gudsruk, K., Kuo, S.-H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M. S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., Yue, Z., Arancio, O., Peterson, B. S., Champagne, F., Dwork, A. J., Goldman, J., i Sulzer, D. (2014). Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits. *Neuron*, 83(5), 1131–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>
375. Tao, Y.-X. (2010). The Melanocortin-4 Receptor: Physiology, Pharmacology, and Pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 31(4), 506–543. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0037>
376. Tarabeux, J., Kebir, O., Gauthier, J., Hamdan, F. F., Xiong, L., Piton, A., Spiegelman, D., Henrion, É., Millet, B., Fathalli, F., Joobor, R., Rapoport, J. L., DeLisi, L. E., Fombonne, É., Mottron, L., Forget-Dubois, N., Boivin, M., Michaud, J. L., Drapeau, P., ... Krebs, M.-O. (2011). Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Translational Psychiatry*, 1(11), e55–e55. <https://doi.org/10.1038/tp.2011.52>
377. Tetreault, N. A., Hakeem, A. Y., Jiang, S., Williams, B. A., Allman, E., Wold, B. J., i Allman, J. M. (2012). Microglia in the Cerebral Cortex in Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 42(12), 2569–2584. <https://doi.org/10.1007/s10803-012-1513-0>
378. Thomas, A., Burant, A., Bui, N., Graham, D., Yuva-Paylor, L. A., i Paylor, R. (2009). Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology*, 204(2), 361–373. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1466-y>
379. Tick, B., Bolton, P., Happé, F., Rutter, M., i Rijsdijk, F. (2016). Heritability of autism spectrum disorders: A meta-analysis of twin studies. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 57(5), 585–595. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12499>
380. Tioleco, N., Silberman, A. E., Stratigos, K., Banerjee-Basu, S., Spann, M. N., Whitaker, A. H., i Turner, J. B. (2021). Prenatal maternal infection and risk for autism in offspring: A meta-analysis. *Autism Research*, 14(6), 1296–1316. <https://doi.org/10.1002/aur.2499>
381. Toyonaga, T., Matsuura, M., Mori, K., Honzawa, Y., Minami, N., Yamada, S., Kobayashi, T., Hibi, T., i Nakase, H. (2016). Lipocalin 2 prevents intestinal inflammation by enhancing phagocytic bacterial clearance in macrophages. *Scientific Reports*, 6(1), 35014. <https://doi.org/10.1038/srep35014>
382. Tremblay, M.-È., Lowery, R. L., i Majewska, A. K. (2010). Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLOS Biology*, 8(11), e1000527. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000527>
383. Triebel, S., Bläser, J., Reinke, H., i Tschesche, H. (1992). A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Letters*, 314(3), 386–388. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81511-j](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81511-j)
384. Tschesche, H., Zölzer, V., Triebel, S., i Bartsch, S. (2001). The human neutrophil lipocalin supports the allosteric activation of matrix metalloproteinases. *European Journal of Biochemistry*, 268(7), 1918–1928. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02066.x>

385. Tsukada, T., Shimada, H., Sakata-Haga, H., Iizuka, H., i Hatta, T. (2019). Molecular mechanisms underlying the models of neurodevelopmental disorders in maternal immune activation relevant to the placenta. *Congenital Anomalies*, 59(3), 81–87. <https://doi.org/10.1111/cga.12323>
386. Tyagi, A., Sharma, S., Wu, K., Wu, S.-Y., Xing, F., Liu, Y., Zhao, D., Deshpande, R. P., D'Agostino, R. B., i Watabe, K. (2021). Nicotine promotes breast cancer metastasis by stimulating N2 neutrophils and generating pre-metastatic niche in lung. *Nature Communications*, 12(1), 474. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20733-9>
387. Urakubo, A., Jarskog, L. F., Lieberman, J. A., i Gilmore, J. H. (2001). Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophrenia Research*, 47(1), 27–36. [https://doi.org/10.1016/s0920-9964\(00\)00032-3](https://doi.org/10.1016/s0920-9964(00)00032-3)
388. Van den Eynde, K., Missault, S., Fransen, E., Raeymaekers, L., Willems, R., Drinkenburg, W., Timmermans, J.-P., Kumar-Singh, S., i Dedeurwaerdere, S. (2014). Hypolocomotive behaviour associated with increased microglia in a prenatal immune activation model with relevance to schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, 258, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.005>
389. Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., i Pardo, C. A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology*, 57(1), 67–81. <https://doi.org/10.1002/ana.20315>
390. Vasung, L., Huang, H., Jovanov-Milošević, N., Pletikos, M., Mori, S., i Kostović, I. (2010). Development of axonal pathways in the human fetal fronto-limbic brain: Histochemical characterization and diffusion tensor imaging. *Journal of Anatomy*, 217(4), 400–417. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01260.x>
391. Ventura, R., i Harris, K. M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 19(16), 6897–6906. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-16-06897.1999>
392. Vichaya, E. G., Gross, P. S., Estrada, D. J., Cole, S. W., Grossberg, A. J., Evans, S. E., Tuvim, M. J., Dickey, B. F., i Dantzer, R. (2019). Lipocalin-2 is dispensable in inflammation-induced sickness and depression-like behavior. *Psychopharmacology*, 236(10), 2975–2982. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05190-7>
393. Volkmar, F. R. (2011). Understanding the social brain in autism. *Developmental Psychobiology*, 53(5), 428–434. <https://doi.org/10.1002/dev.20556>
394. Walf, A. A., i Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
395. Wang, G., Weng, Y.-C., Chiang, I.-C., Huang, Y.-T., Liao, Y.-C., Chen, Y.-C., Kao, C.-Y., Liu, Y.-L., Lee, T.-H., i Chou, W.-H. (2020). Neutralization of Lipocalin-2 Diminishes Stroke-Reperfusion Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6253. <https://doi.org/10.3390/ijms21176253>
396. Wang, Y., Zhang, Y.-B., Liu, L.-L., Cui, J.-F., Wang, J., Shum, D. H. K., van Amelsvoort, T., i Chan, R. C. K. (2017). A Meta-Analysis of Working Memory

- Impairments in Autism Spectrum Disorders. *Neuropsychology Review*, 27(1), 46–61. <https://doi.org/10.1007/s11065-016-9336-y>
397. Wei, L., Du, Y., Wu, W., Fu, X., i Xia, Q. (2018). Elevation of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) levels in schizophrenia patients. *Journal of Affective Disorders*, 226, 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.10.002>
 398. Weinberger, D. r., i Marenco, S. (2003). Schizophrenia as a Neurodevelopmental Disorder. W *Schizophrenia* (s. 326–348). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470987353.ch18>
 399. Weir, R. K., Bauman, M. D., Jacobs, B., i Schumann, C. M. (2018). Protracted dendritic growth in the typically developing human amygdala and increased spine density in young ASD brains. *The Journal of comparative neurology*, 526(2), 262–274. <https://doi.org/10.1002/cne.24332>
 400. Wesseling, H., Guest, P. C., Lee, C.-M., Wong, E. H., Rahmoune, H., i Bahn, S. (2014). Integrative proteomic analysis of the NMDA NR1 knockdown mouse model reveals effects on central and peripheral pathways associated with schizophrenia and autism spectrum disorders. *Molecular Autism*, 5, 38. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-38>
 401. Wierzbica-Bobrowicz, T., Lewandowska, E., Lechowicz, W., Stepień, T., i Pasennik, E. (2005). Quantitative analysis of activated microglia, ramified and damage of processes in the frontal and temporal lobes of chronic schizophrenics. *Folia Neuropathologica*, 43(2), 81–89.
 402. Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M. H., i Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46), 17513–17518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602841103>
 403. Williams, M., Pearce, R. K. B., Hirsch, S. R., Ansorge, O., Thom, M., i Maier, M. (2014). Fibrillary astrocytes are decreased in the subgenual cingulate in schizophrenia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 264(4), 357–362. <https://doi.org/10.1007/s00406-013-0482-4>
 404. Wischhof, L., Irrsack, E., Osorio, C., i Koch, M. (2015). Prenatal LPS-exposure—A neurodevelopmental rat model of schizophrenia—Differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 57, 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.10.004>
 405. Wu, H., Santoni-Rugiu, E., Ralfkiaer, E., Porse, B. T., Moser, C., Høiby, N., Borregaard, N., i Cowland, J. B. (2010). Lipocalin 2 is protective against E. coli pneumonia. *Respiratory Research*, 11(1), 96. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-96>
 406. Wu, W.-L., Adams, C. E., Stevens, K. E., Chow, K.-H., Freedman, R., i Patterson, P. H. (2015). The interaction between maternal immune activation and alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in regulating behaviors in the offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 46, 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.02.005>
 407. Wu, Y., Qi, F., Song, D., He, Z., Zuo, Z., Yang, Y., Liu, Q., Hu, S., Wang, X., Zheng, X., Yang, J., Yuan, Q., Zou, J., Guo, K., i Yao, Z. (2018). Prenatal influenza

- vaccination rescues impairments of social behavior and lamination in a mouse model of autism. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 228. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1252-z>
408. Wu, Y., Qi, F., Song, D., He, Z., Zuo, Z., Yang, Y., Liu, Q., Hu, S., Wang, X., Zheng, X., Yang, J., Yuan, Q., Zou, J., Guo, K., i Yao, Z. (2018). Prenatal influenza vaccination rescues impairments of social behavior and lamination in a mouse model of autism. *Journal of Neuroinflammation*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1252-z>
 409. Xing, C., Wang, X., Cheng, C., Montaner, J., Mandeville, E., Leung, W., van Leyen, K., Lok, J., Wang, X., i Lo, E. H. (2014). Neuronal Production of Lipocalin-2 as a Help-Me Signal for Glial Activation. *Stroke*, 45(7), 2085–2092. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.005733>
 410. Xu, M.-J., Feng, D., Wu, H., Wang, H., Chan, Y., Kolls, J., Borregaard, N., Porse, B., Berger, T., Mak, T. W., Cowland, J. B., Kong, X., i Gao, B. (2015). Liver is the major source of elevated serum lipocalin-2 levels after bacterial infection or partial hepatectomy: A critical role for IL-6/STAT3. *Hepatology*, 61(2), 692–702. <https://doi.org/10.1002/hep.27447>
 411. Xu, W.-X., Zhang, J., Hua, Y.-T., Yang, S.-J., Wang, D.-D., i Tang, J.-H. (2020). An Integrative Pan-Cancer Analysis Revealing LCN2 as an Oncogenic Immune Protein in Tumor Microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.605097>
 412. Xu-Friedman, M. A., Harris, K. M., i Regehr, W. G. (2001). Three-Dimensional Comparison of Ultrastructural Characteristics at Depressing and Facilitating Synapses onto Cerebellar Purkinje Cells. *The Journal of Neuroscience*, 21(17), 6666–6672. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-17-06666.2001>
 413. Yamaguchi, Y., i Miura, M. (2015). Programmed Cell Death in Neurodevelopment. *Developmental Cell*, 32(4), 478–490. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.019>
 414. Yan, L., Yang, F., Wang, Y., Shi, L., Wang, M., Yang, D., Wang, W., Jia, Y., So, K.-F., i Zhang, L. (2024). Stress increases hepatic release of lipocalin 2 which contributes to anxiety-like behavior in mice. *Nature Communications*, 15(1), 3034. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47266-9>
 415. Yang, A. C., i Tsai, S.-J. (2017). New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1689. <https://doi.org/10.3390/ijms18081689>
 416. Yang, J., Bielenberg, D. R., Rodig, S. J., Doiron, R., Clifton, M. C., Kung, A. L., Strong, R. K., Zurakowski, D., i Moses, M. A. (2009). Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), 3913. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810617106>
 417. Yang, J., Goetz, D., Li, J.-Y., Wang, W., Mori, K., Setlik, D., Du, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Strong, R., i Barasch, J. (2002). An Iron Delivery Pathway Mediated by a Lipocalin. *Molecular Cell*, 10(5), 1045–1056. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00710-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00710-4)
 418. Yang, L., Li, Z., Liu, G., Li, X., i Yang, Z. (2022). Developmental Origins of Human Cortical Oligodendrocytes and Astrocytes. *Neuroscience Bulletin*, 38(1), 47–68. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00759-9>

419. Yoshihara, Y., De Roo, M., i Muller, D. (2009). Dendritic spine formation and stabilization. *Current Opinion in Neurobiology*, 19(2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.05.013>
420. Zablotzky, B., Black, L. I., Maenner, M. J., Schieve, L. A., Danielson, M. L., Bitsko, R. H., Blumberg, S. J., Kogan, M. D., i Boyle, C. A. (2019). Prevalence and Trends of Developmental Disabilities among Children in the United States: 2009–2017. *Pediatrics*, 144(4), e20190811. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-0811>
421. Zaretsky, M. V., Alexander, J. M., Byrd, W., i Bawdon, R. E. (2004). Transfer of Inflammatory Cytokines Across the Placenta. *Obstetrics & Gynecology*, 103(3), 546. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000114980.40445.83>
422. Zecevic, N. (1998). Synaptogenesis in layer I of the human cerebral cortex in the first half of gestation. *Cerebral Cortex*, 8(3), 245–252. <https://doi.org/10.1093/cercor/8.3.245>
423. Zecevic, N. (2004). Specific characteristic of radial glia in the human fetal telencephalon. *Glia*, 48(1), 27–35. <https://doi.org/10.1002/glia.20044>
424. Zhang, P.-X., Zhang, F.-R., Xie, J.-J., Tao, L.-H., Lü, Z., Xu, X.-E., Shen, J., Xu, L.-Y., i Li, E.-M. (2012). Expression of NGAL and NGALR in human embryonic, fetal and normal adult tissues. *Molecular Medicine Reports*, 6(4), 716–722. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.980>
425. Zhang, Q., Li, Z., Xie, L., Cao, S., Cui, Z., Shi, B., i Chen, Y. (2023). Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a potential biomarker for cognitive decline in spinal cord injury. *Frontiers in Neurology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1120446>
426. Zhang, T.-Y., i Meaney, M. J. (2010). Epigenetics and the Environmental Regulation of the Genome and Its Function. *Annual Review of Psychology*, 61(1), 439–466. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.60.110707.163625>
427. Zhang, Y., Foncea, R., Deis, J. A., Guo, H., Bernlohr, D. A., i Chen, X. (2014). Lipocalin 2 expression and secretion is highly regulated by metabolic stress, cytokines, and nutrients in adipocytes. *PloS One*, 9(5), e96997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096997>
428. Zhang, Z., i van Praag, H. (2015). Maternal immune activation differentially impacts mature and adult-born hippocampal neurons in male mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 45, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.10.010>
429. Zhao, J., Chen, H., Zhang, M., Zhang, Y., Qian, C., Liu, Y., He, S., Zou, Y., i Liu, H. (2016). Early expression of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is associated with neurological severity immediately after traumatic brain injury. *Journal of the Neurological Sciences*, 368, 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.07.060>
430. Zhou, Y., Zhang, W., Chen, F., Hu, S., i Jiang, H. (2021). Maternal infection exposure and the risk of psychosis in the offspring: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Psychiatric Research*, 135, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2020.12.065>
431. Zhu, C.-Y., Jiang, H.-Y., i Sun, J.-J. (2022). Maternal infection during pregnancy and the risk of attention-deficit/hyperactivity disorder in the offspring: A systematic review and meta-analysis. *Asian Journal of Psychiatry*, 68, 102972. <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2021.102972>

432. Zhu, F., Zheng, Y., Liu, Y., Zhang, X., i Zhao, J. (2014). Minocycline alleviates behavioral deficits and inhibits microglial activation in the offspring of pregnant mice after administration of polyriboinosinic–polyribocytidilic acid. *Psychiatry Research*, 219(3), 680–686. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.06.046>

8. Spis publikacji własnych

1. Trojan, M., Kanigowski, D., Bijoch, Ł., **Pękała, M.**, Legutko, D., Beroun, A., ... i Kodirov, S. A. (2024). Deciphering the peculiarities of cell types in the septum. *Neuroscience*, 565, 327-341.
2. Bijoch, Ł., Klos, J., **Pękała, M.**, Fiołna, K., Kaczmarek, L., i Beroun, A. (2023). Diverse processing of pharmacological and natural rewards by the central amygdala. *Cell Reports*, 42(9).
3. Roszkowska, M., Krysiak, A., Majchrowicz, L., Nader, K., Beroun, A., Michaluk, P., Nader, K., **Pekala, M.**, ... i Kalita, K. (2022). SRF depletion in early life contributes to social interaction deficits in the adulthood. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(5), 278.
4. Frączek, K., Kowalczyk, A., **Pekala, M.**, Kasarello, K., Sygitowicz, G., Sulejczak, D., ... i Kleczkowska, P. (2021). The positive and negative outcome of morphine and disulfiram subacute co-administration in rats in the absence of ethanol challenge. *Pharmaceutics*, 13(1), 29.
5. Bijoch, L., **Pekala, M.**, i Beroun, A. (2021). Molekularne podstawy działania wybranych substancji psychoaktywnych. *Postępy Biochemii*, 67(2), 141-156.
6. **Pekala, M.**, Doliwa, M., i Kalita, K. (2020). Impact of maternal immune activation on dendritic spine development. *Developmental Neurobiology* 81(5), 524-545
7. Nader, K., Krysiak, A., Beroun, A., **Pekala, M.**, Szymanska, M., Kuzniewska, B., ... i Kalita, K. (2019). Loss of serum response factor in mature neurons in the dentate gyrus alters the morphology of dendritic spines and hippocampus-dependent behavioral tasks. *Brain Structure and Function*, 224(8), 2691-2701.
8. Kowalczyk, A., Kleczkowska, P., Konop, M., Kasarello, K., Czuwara, J., **Pekala, M.**, Sosnowski, P., Sacharczuk, M., Cudnoch-Jedrzejska, A., Rudnicka, L., i Bujalska-Zadrozny M. (2018). Determination of the anti-inflammatory properties and analgesic activity of the AA3052 chimeric peptide against CFA-induced inflammatory pain. *Animal Science Papers and Reports*, 36(2), 219-240.