

Karolina Protokowicz

**Udział metaloproteazy macierzowej 9 (MMP-9) w
powstawaniu zmian w zachowaniu społecznym w mysim
modelu wczesnej stymulacji układu odpornościowego
czynnikiem o pochodzeniu bakteryjnym**

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Neurobiologii
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:
Prof. dr hab. Leszek Kaczmarek

Warszawa, 2024

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować mojemu Promotorowi, prof. dr. hab. Leszkowi Kaczmarkowi, za wsparcie merytoryczne, celne wskazówki oraz wyrozumiałość okazywaną podczas przygotowywania niniejszej rozprawy. Szczególnie dziękuję za „wrzucenie na głęboką wodę” oraz stworzenie przestrzeni do popełniania błędów i wyciągania z nich cennych lekcji, co znacząco wpłynęło na mój rozwój naukowy i osobisty.

Serdecznie dziękuję wszystkim członkom Pracowni Neurobiologii oraz pozostałym pracownikom Instytutu, z którymi miałam okazję współpracować. Szczególnie wdzięczna jestem tym, którzy znaleźli czas aby odpowiedzieć na moje liczne pytania i wątpliwości.

Ostatnie, ale niemniej ważne podziękowania składam na ręce i łapki najbliższych: przyjaciół, rodziny i ukochanych królików. Wasze wsparcie było bezcenne.

Badania opisane w pracy doktorskiej zostały zrealizowane dzięki funduszom Narodowego Centrum Nauki oraz Fundacji na rzecz Nauki Polskiej: Międzynarodowe Agendy Badawcze: BRAINCITY Centrum Doskonałości Badań nad Plastycznością Neuronálną i Chorobami Mózgu MAB 8/2017).



**Fundacja na rzecz
Nauki Polskiej**



Spis treści

Streszczenie.....	10
Abstract.....	12
Alfabetyczny wykaz najczęściej stosowanych skrótów	14
1. WSTĘP	16
1.1 Zaburzenia neurorozwojowe.....	16
1.1.1 Czynniki genetyczne	17
1.1.2 Czynniki środowiskowe	18
1.2 Odpowiedź układu odpornościowego.....	21
1.2.1 Różnice w odpowiedzi odpornościowej ze względu na płeć	25
1.2.2 Stan zapalny w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), rola bariery krew-mózg	27
1.3 Zwierzęce modele zaburzeń neurorozwojowych.....	29
1.4 Metaloproteaza macierzowa 9	35
2. CELE PRACY	40
3. MATERIAŁY I METODY	41
3.1 Zwierzęta wykorzystywane w doświadczeniach	41
3.1.1 Zwierzęta.....	41
3.1.2 Warunki bytowe	41
3.1.3 Identyfikacja genotypu (genotypowanie).....	42
3.2 Stymulacja układu odpornościowego czynnikiem o pochodzeniu bakteryjnym	42
3.3 Testy behawioralne	43
3.3.1 Obserwacja w klatce.....	43
3.3.2 Uniesiony labirynt krzyżowy (EPM)	43
3.3.3 Test trójkomorowy	44
3.3.4 Test w aparacie Eco-HAB™.....	46
3.4 Metody biologii molekularnej.....	49
3.4.1 Podstawowe odczynniki chemiczne.....	49

3.4.2	Zestawy komercyjne	50
3.4.3	Roztwory i bufory	51
3.4.4	Pobieranie i utrwalanie tanek	51
3.4.5	Metody pracy z białkami.....	52
3.4.5.1	Izolacja i pomiar stężenia białka	52
3.4.5.2	Multipleksowy test immunoenzymatyczny - Luminex®.....	52
3.4.5.3	Zymografia żelowa.....	54
3.4.6	Metody pracy z materiałem genetycznym	55
3.4.6.1	Izolacja i pomiar stężenia RNA	55
3.4.6.2	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR)	
	56	
3.5	Analiza danych.....	60
3.5.1	Programy	60
3.5.2	Analizy statystyczne.....	61
4.	WYNIKI.....	62
4.1	Charakterystyka zachowania dorosłych myszy C57BL/6J (B6) po aktywacji układu odpornościowego w 7 dniu życia.....	62
4.1.1	Aktywność zwierząt B6	62
4.1.2	Emocjonalność zwierząt B6	67
4.1.3	Socjalność zwierząt B6	70
4.2	Odpowiedź układu odpornościowego siedmiodniowych myszy B6 na LPS.....	76
4.2.1	Stężenia białek w surowicy osesków	77
4.2.2	Aktywność żelatynolityczna w OUN	82
4.2.3	Ekspresja genów związanych z odpowiedzią układu odpornościowego w różnych strukturach OUN	87
4.3	Rola MMP-9 w kształtowaniu zachowania dorosłych myszy po wczesnej aktywacji układu odpornościowego.....	90
4.3.1	Aktywność zwierząt linii MMP-9 KO	90

4.3.2	Emocjonalność zwierząt linii MMP-9 KO.....	96
4.3.3	Socjalność zwierząt linii MMP-9 KO	100
5.	DYSKUSJA.....	107
5.1	Jednorazowe podanie LPS w siódmym dniu życia prowadzi do długotrwałych zmian w zachowaniu myszy	108
5.2	Stan zapalny u mysich osesków ma różny przebieg ze względu na płeć	114
5.3	Wpływ wczesnego podania LPS na długotrwałe zmiany w zachowaniu jest zależny od linii zwierząt.....	117
5.4	MMP-9 reguluje zmiany w zachowaniu społecznym po wczesnej stymulacji układu odpornościowego	119
5.5	Hipotetyczny mechanizm stojący za zmianami w zachowaniu zwierząt poddanych wczesnej stymulacji układu odpornościowego	122
6.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	125
7.	BIBLIOGRAFIA	127
8.	Publikacje własne doktorantki.....	157

Streszczenie

Odbieranie bodźców i odpowiednie reagowanie na nie są kluczowe dla przetrwania w złożonym środowisku, a koordynację tych funkcji zapewnia układ nerwowy. Jego rozwój jest precyzyjnie regulowany przez liczne czynniki, a zakłócenia tego procesu mogą prowadzić do powstawania zaburzeń neurorozwojowych (ang. *neurodevelopmental disorders*, NDD), takich jak zaburzenia ze spektrum autyzmu (ang. *autism spectrum disorder*, ASD), ADHD czy zespół Tourette'a. NDD charakteryzują się szerokim zakresem objawów, w tym dysfunkcjami społecznymi, niepełnosprawnością intelektualną oraz problemami somatosensorycznymi. Mimo, że dokładne przyczyny NDD pozostają niejasne, badania wskazują na wpływ czynników genetycznych i środowiskowych, w tym stanu zapalnego. Istotną rolę w regulacji stanu zapalnego odgrywa metaloproteaza macierzowa 9 (MMP-9), która uczestniczy również w procesach plastyczności synaptycznej. Dodatkowo w przebiegu wielu NDD wykryto podwyższony poziom MMP-9 we krwi i mózgu pacjentów.

Badania na zwierzętach często koncentrują się na okresie prenatalnym, modelując aktywację układu odpornościowego matki. Z uwagi na fakt, że rozwój układu nerwowego u ludzi i myszy jest kontynuowany po narodzinach, w niniejszej pracy skupiono się na okresie postnatalnym. Szczególną uwagę poświęcono krytycznemu etapowi rozwoju układu nerwowego – intensywnej synaptogenezie, która przypada na około 7 dzień życia myszy. W trakcie tego kluczowego etapu wystawiono układ odpornościowy zwierząt na pojedynczą iniekcję bakteryjnego lipopolisacharydu (LPS, 0,05 mg/kg), a jako kontrolę zastosowano fizjologiczny roztwór soli (NaCl). Badania miały na celu ocenę wpływu wczesnej stymulacji układu odpornościowego na zachowanie dorosłych myszy.

W pierwszej kolejności postanowiono scharakteryzować zmiany w zachowaniu dorosłych zwierząt po wczesnej stymulacji układu odpornościowego. W tym celu wykorzystano testy behawioralne mierzące aktywność, emocjonalność oraz socjalność myszy (obserwacja w klatce, test zawieszonego labiryntu krzyżowego, test trójkomorowy oraz test w zautomatyzowanej klatce Eco-HAB™). Dorosłe zwierzęta poddane stymulacji układu odpornościowego były mniej aktywne oraz mniej lękliwe. Dodatkowo zauważono, że podanie LPS ma inny wpływ na zachowanie społeczne samców i samic. Samce traktowane LPS wykazywały słabsze zainteresowanie nieznanym bodźcem socjalnym przy wyższej preferencji do spędzania czasu w grupie. Natomiast w grupie samic zaobserwowano, że podanie LPS powodowało bardziej chętnie eksplorowanie nieznanego

zapachu społecznego oraz spędzanie krótszego czasu w znanej grupie w porównaniu do samic z grupy kontrolnej.

W drugiej części eksperymentów zbadano molekularne zmiany u siedmiodniowych myszy po podaniu LPS. Analizowano stężenia białek związanych ze stanem zapalnym w surowicy, aktywność żelatynolityczną metaloproteaz oraz zmiany ekspresji genów w mózgach. Stymulacja za pomocą LPS prowadziła do wzrostu stężenia ośmiu białek we krwi, w tym MMP-9. Najsilniejsza odpowiedź odpornościowa pojawiła się 2 godziny po podaniu LPS. W mózgu zaobserwowano wyższą aktywność MMP-9 w korze mózgowej obu płci, a dodatkowo u samców w hipokampie. Oprócz tego po 6 godzinach od podania LPS stwierdzono wyższą ekspresję genów dla *tnf-α*, *il-6* i *mmp-9*, zwłaszcza w prążkowi.

W trzeciej części badań oceniono wpływ genetycznie obniżonego poziomu MMP-9 na rozwój zmian w zachowaniu wywołanych podaniem LPS u siedmiodniowych osesków. Eksperyment przeprowadzono na zwierzętach z uszkodzonym genem MMP-9 (nokauty, KO) oraz ich rodzeństwie z niezmienionym genotypem (WT). Przeanalizowano ich zachowanie w dorosłości, wykorzystując te same metody badawcze, co w części pierwszej. Podanie LPS, podobnie jak w pierwszym eksperymencie, obniżyło aktywność zwierząt. Oprócz tego zaobserwowano, że myszy linii MMP-9 KO są bardziej lękliwe. Podobnie jak w przypadku pierwszej grupy zwierząt samce traktowane LPS chętniej spędzały czas w grupie, natomiast samice unikały się wzajemnie. Najciekawsze wyniki uzyskano jednak w przypadku reakcji na nieznany bodziec społeczny: samce WT z grupy LPS unikały nieznanego bodźca, natomiast samice WT LPS były bardziej zainteresowane nieznany zapachem społecznym. Co ważne, takiego efektu nie zaobserwowano u zwierząt KO.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych badań można stwierdzić, że jednorazowe podanie LPS w okresie intensywnej synaptogenezy może być wykorzystywane jako nowy myszy model zaburzeń NDD. Dodatkowo w niniejszej rozprawie wykazano, że MMP-9 pełni istotną rolę w powstawaniu konkretnego typu zaburzeń społecznych – reakcji na nieznany bodziec. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań nad molekularnym mechanizmem NDD oraz rolą MMP-9 w diagnozowaniu lub terapii niektórych NDD.

Abstract

A rapidly changing environment requires a well-functioning nervous system to receive, process, and respond to numerous stimuli. Consequently, the development of the nervous system is tightly regulated and strictly timed. Due to the complexity and fragility of this process, any disruption can lead to abnormal brain functioning and, subsequently, to neurodevelopmental disorders (NDDs) such as autism spectrum disorder (ASD), ADHD, or Tourette syndrome. The above-mentioned NDDs are characterized by several symptoms affecting cognitive skills, sociability, or sensorimotor processing. Although the exact etiology of NDD remains unclear, research indicates the influence of genetic and environmental factors, including inflammation. One of the mediators of inflammation is matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), also known for its role in synaptic plasticity. Interestingly, elevated levels of MMP-9 were observed in the serum and brains of NDD patients.

Studies on NDDs and inflammation mainly focus on pregnancy and use animal models of maternal immune activation. Since nervous system development continues after birth, this thesis focuses on the postnatal period. One key development period is exuberant synaptogenesis, which occurs around postnatal day 7 (P7) in mice. During this time, mouse pups were injected i.p. with a single dose of bacterial lipopolysaccharide (LPS, 0.05 mg/kg) or physiological saline as a control (NaCl). The study aimed to evaluate the impact of early immune system stimulation on the behavior of adult mice.

First, changes in the behavior of adult animals following early immune system stimulation were characterized. Behavioral tests measuring mice activity, emotionality, and sociability were conducted (cage observation, elevated plus maze test, three-chamber test, and Eco-HAB™ automated cage test). After immune system activation, adult animals were found to be less active and less anxious. Additionally, it was observed that the administration of LPS had different effects on social behavior in males and females. Male mice treated with LPS showed reduced interest in an unfamiliar social stimulus while exhibiting a higher preference for spending time in a group. In contrast, in the female group, LPS administration resulted in greater exploration of an unfamiliar social scent and less time spent in a familiar group compared to the control group of females.

In the second part of the experiments, molecular changes were examined in P7 mice following LPS administration. The concentration of inflammation-related proteins in the serum, the gelatinolytic activity of metalloproteases, and gene expression changes

in the brain were analyzed. LPS stimulation increased the levels of eight proteins in the blood, including MMP-9, with the most potent immune response in blood observed 2 hours after LPS injection. In the brain, higher MMP-9 activity was detected in the cortex of both sexes and additionally in the hippocampus of males. Furthermore, 6 hours after LPS administration, increased expression of genes for *tnf- α* , *il-6*, and *mmp-9* was found, particularly in the striatum.

The third part of the study assessed the impact of genetically reduced MMP-9 levels on the development of LPS-induced behavioral changes in P7 mice pups. The experiment was conducted on animals lacking MMP-9 (knock-out, KO) and their wild-type (WT) littermates. In adulthood, their behavior was analyzed using the same methods as in the first part of the study. As in the first experiment, LPS administration reduced the animals' activity. Additionally, it was observed that MMP-9 KO mice exhibited higher anxiety levels. Like the initial group, male mice treated with LPS preferred spending time in a group, whereas females avoided one another. These effects were observed regardless of the genotype. The most intriguing results concerned responses to an unfamiliar social stimulus: WT males from the LPS group avoided the unfamiliar social stimulus, whereas WT females from the LPS group were more interested in the unfamiliar social scent. Notably, this effect was not observed in KO animals.

In summary, based on this study's findings, it can be concluded that a single LPS administration during exuberant synaptogenesis can serve as a novel mouse model for NDDs. Additionally, this dissertation demonstrated that MMP-9 plays a significant role in developing a specific type of social impairment—responses to an unfamiliar stimulus. The results provide a foundation for further research into the molecular mechanisms underlying NDD and the role of MMP-9 in diagnosing or treating certain NDD conditions.

Alfabetyczny wykaz najczęściej stosowanych skrótów

NDD	zaburzenia neurorozwojowe, ang. <i>neurodevelopmental disorders</i>
ASD	zaburzenia ze spektrum autyzmu, ang. <i>autism spectrum disorders</i>
ADHD	zespół nadpobudliwości psychoruchowej, ang. <i>attention deficit hypermobility disorder</i>
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
MIA	model aktywacji układu odpornościowego matki, ang. <i>maternal immune activation</i>
HPA	oś podwzgórze-przysadka-nadnercza, ang. <i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>
TNF-α	czynnik martwicy nowotworów, ang. <i>tumor necrosis factor α</i>
NF-κB	jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B, ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
TLR4	receptor toll-podobny 4, ang. <i>toll-like receptor 4</i>
MyD88	białko adaptorowe Myd88, ang. <i>myeloid differentiation primary response 88</i>
TLR4-MyD88-NF-κB	ścieżka sygnałowa prowadząca do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B
LPS	lipopolisacharyd
BBB	bariera krew-mózg, ang. <i>blood-brain barrier</i>
MMP-9	metaloproteaza macierzowa 9, ang. <i>matrix metalloproteinase 9</i>
KO	nokaut, homozygotyczny mutant z unieczynnionym genem, ang. <i>knock-out</i>
WT	mysz niezmieniona genetycznie, o dzikim genotypie, ang. <i>wild-type</i>
i.p.	dootrzewnowe podanie substancji, ang. <i>intraperitoneal</i>
EPM	uniesiony labirynt krzyżowy, ang. <i>elevated plus maze</i>
mRNA	matrycowe RNA, ang. <i>messenger RNA</i>
B6	szczep wsobny myszy C57BL/6J

P7	7 dzień po urodzeniu, ang. <i>postnatal day 7</i>
SEM	błąd standardowy średniej, ang. <i>standard error of the mean</i>

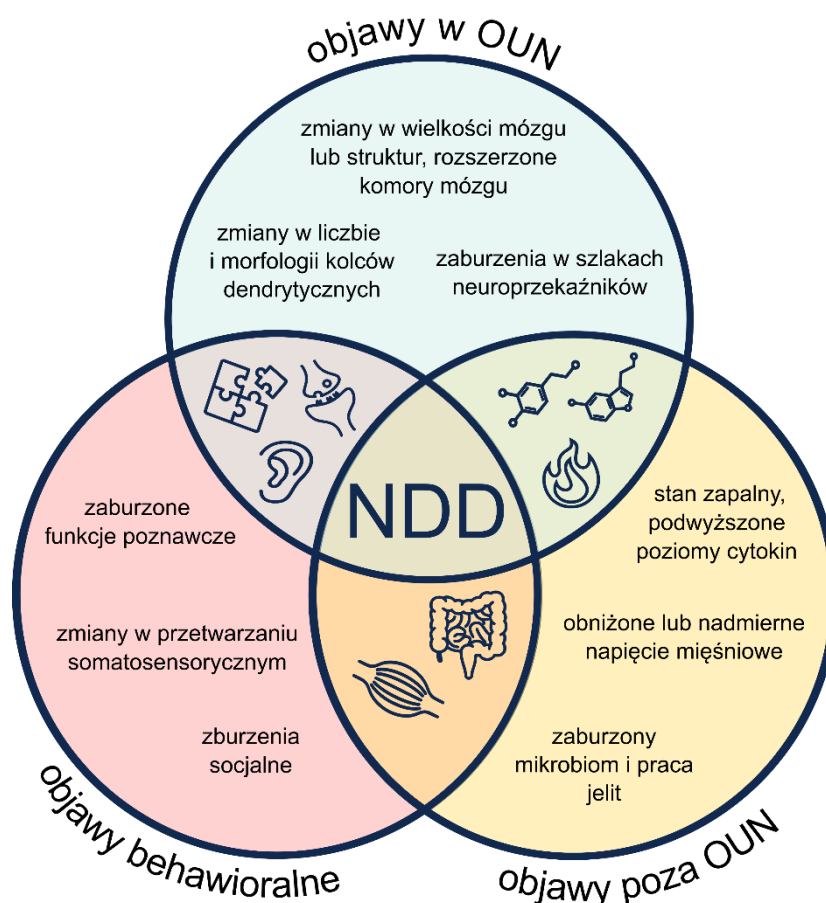
Wykaz skrótów użytych do określenia badanych grup

NaCl	myszy poddane iniekcji fizjologicznym roztworem soli
LPS	myszy poddane iniekcji czynnikiem bakteryjnym - lipopolisacharydem
WT NaCl	niezmienione genetycznie myszy linii MMP-9 KO, traktowane NaCl
WT LPS	niezmienione genetycznie myszy linii MMP-9 KO, traktowane LPS
KO NaCl	homozygotyczne mysie nokauty MMP-9, traktowane NaCl
KO LPS	homozygotyczne mysie nokauty MMP-9, traktowane LPS

1. WSTĘP

1.1 Zaburzenia neurorozwojowe

Rozwój układu nerwowego jest ściśle kontrolowany przez szereg czynników. Nieprawidłowości w tym procesie mogą prowadzić do wielu zmian w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego (OUN) oraz całego organizmu. Zaburzenia, których przyczyn dopatruje się na tym etapie rozwoju nazywa się zbiorczo zaburzeniami neurorozwojowymi (ang. *neurodevelopmental disorders*, NDD). Zgodnie z DSM-V klasyfikuje się 6 grup takich schorzeń: zaburzenia ze spektrum autyzmu (ang. *autism spectrum disorder*, ASD), zespół nadpobudliwości psychoruchowej (ang. *attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD), niepełnosprawność intelektualna, zaburzenia komunikacji, zaburzenia ruchowe i specyficzne trudności w uczeniu się¹. Często zdarza się postawienie diagnozy więcej niż jednego zaburzenia.



Ryc. 1.1. Diagram przedstawiający grupy objawów wraz z przykładami. Symptomy obserwowane u pacjentów składają się na skomplikowany i różnorodny obraz zaburzeń neurorozwojowych¹⁻⁶. Wszystkie ryciny zamieszczone w niniejszej pracy są oryginalne i zostały przygotowane samodzielnie przez autorkę.

Uważa się, że objawy obserwuje się już w dzieciństwie i cechą charakterystyczną NDD jest fakt utrzymywania się symptomów przez całe życie. Pomimo wielu badań i prób ustalenia molekularnych wskaźników poszczególnych schorzeń, diagnoza większości z nich cały czas opiera się na objawach widocznych w zachowaniu. Objawy te mogą być związane z: 1) zachowaniem społecznym, np.: unikanie kontaktów, niezrozumienie norm społecznych, opóźnienie w rozwoju mowy czy całkowity brak komunikacji werbalnej; 2) zaburzenia kognitywne, np.: opóźnienie w nauce, trudności w skupieniu uwagi, trudność w przetwarzaniu informacji 3) zaburzenia psychoruchowe, np.: nadmierna ruchliwość, echolalia, zachowania repetytywne, autoagresja czy impulsywność^{1,7-9}. Pomimo, że diagnozę stawia się na podstawie objawów behawioralnych, u części pacjentów z NDD można stwierdzić wiele innych wspólnych symptomów klinicznych. Jedną z hipotez wyjaśniających mechanizmy NDD sugeruje, że kluczową rolę odgrywają zaburzenia w przekaźnictwie synaptycznym. Wskazują na to zmiany w liczbie i morfologii koleców dendrytycznych, które są nośnikami synaps pobudzających, oraz dysfunkcje szlaków neuroprzekaźników, takich jak serotonina, dopamina czy kwas γ -aminomasłowy (GABA)^{3,10,11}. Na rycinie 1.1 zaprezentowano grupy objawów obserwowanych u pacjentów z NDD. Wśród przyczyn występowania NDD wymienia się często czynniki genetyczne. Przykładem zaburzeń neurorozwojowych, których podłoże jest bezpośrednio związane z zaburzeniami genetycznym są: zespół Downa (trisomia chromosomu 21), zespół Angelmana i Pradera-Willego (mikrodelecja w regionie q11-13 kolejno: matczynego lub ojcowskiego chromosomu 15) lub zespół łamliwego chromosomu X (powielenie trójki CGG w genie *frn1* na chromosomie X)¹²⁻¹⁴. W przypadku zaburzeń takich jak ASD, ADHD czy schizofrenia, dokładna etiologia nie jest poznana i obok tła genetycznego wymienia się czynniki środowiskowe.

1.1.1 Czynniki genetyczne

Badania nad genetycznym podłożem zaburzeń neurorozwojowych wymieniają nawet 1500 „genów ryzyka”, tj. genów, w których mutacje związane są z większym prawdopodobieństwem wystąpienia ASD, ADHD czy innych zaburzeń neurorozwojowych^{15,16}. W celu łatwiejszego śledzenia postępów w badaniach tworzone są bazy danych zbierające informacje o genach ryzyka. Przykładem może być SFARI gene, baza danych fundacji Simons Foundation Autism Research Initiative, która wymienia ponad 1200 genów związanych z ASD. Klasyfikacja w takich bazach może być związana z częstością występowania, dziedzicznością (np. mutacja *de novo*, dziedziczenie

recesywne), funkcjonalnością genu (np. brak funkcji lub zmieniona funkcja). Dokonuje się też podziału ze względu na molekularny mechanizm zachodzenia mutacji, czy jest on związany ze zmianą w obrębie jednego genu np. delecja fragmentu, polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP); fragmentu chromosomu, np. utrata części ramienia, duplikacja fragmentu, translokacja na inny chromosom; lub aberracji chromosomalnej np. aneuploidia lub polisomia. Wśród „genów ryzyka” można wymienić te związane z przekazywaniem synaptycznym np. *shank3*, *cntnap2* czy *syn1*^{4,17,18}; działaniem rybosomów np. *fmr1*¹⁹ czy migracją komórek np. *reln*^{20,21}.

1.1.2 Czynniki środowiskowe

Stan zapalny

Jednym z wymienianych czynników ryzyka diagnozy NDD jest stan zapalny w ciąży lub w okresie wczesnego dzieciństwa^{22–24}. Najczęściej wymienia się aktywację układu odpornościowego matki (ang. *maternal immune activation*, MIA) jako czynnik ryzyka związany ze stanem zapalnym. Co ciekawe, stan zapalny matki nie musi być związany z infekcją wirusową, bakteryjną czy grzybiczą. Czynnikiem ryzyka jest także chroniczny stan zapalny w trakcie ciąży. Wśród jednostek chorobowych związanych z przewlekłym stanem zapalnym można wymienić otyłość, alergie, choroby autoimmunologiczne czy depresję^{25,26}. W pracy Lopez-Aranda i współpracowników wykazano, że hospitalizacja pomiędzy 1 a 3 rokiem życia z powodu infekcji wirusowej lub bakteryjnej także podnosiła ryzyko postawienia diagnozy zaburzeń neurorozwojowych²⁴. U pacjentów z NDD, najczęściej w ich krwi, stwierdza się podwyższone poziomy mediatorów stanu zapalnego (cytokin czy chemokin), a także zaburzoną równowagę między frakcjami komórek układu odpornościowego^{27,28}. Ważnych dowodów na rolę stanu zapalnego w NDD dostarczają także badania nad zastosowaniem leków przeciwzapalnych u pacjentów z tymi zaburzeniami. W pracy Zawadzkiej i współpracowników zebrano dane wskazujące, że obniżenie stanu zapalnego skutkowało osłabieniem objawów behawioralnych u pacjentów z ASD²⁹. Dodatkowo, badania na mózgach pacjentów z ASD lub schizofrenią wykazały istotne różnice w liczbie i morfologii kolców dendrytycznych³. W pracy przeglądowej Pękały i współpracowników zestawiono te dane z badaniami na zwierzęcych modelach, w których wykazano, że MIA wpływa na zmiany w budowie kolców dendrytycznych u potomstwa³.

Zaburzenia metaboliczne

Kolejnym czynnikiem zwiększającym prawdopodobieństwo wystąpienia NDD są zaburzenia metaboliczne. Jako przykład może posłużyć fenyloketonuria. Jest to choroba związana z niedoborem hydroksylazy fenyloalaniny, która jest dziedziczona w sposób recesywny. Brak tego enzymu lub jego niskie stężenie prowadzi do gromadzenia się fenyloalaniny, co przy braku leczenia może prowadzić do niepełnosprawności intelektualnej, drgawek i zaburzeń behawioralnych³⁰. Ze względu na częste występowanie tego schorzenia (w Polsce 1 na ok. 7500 urodzeń) tuż po urodzeniu stosuje się badania przesiewowe w celu wykrycia fenyloketonurii³¹. Warto dodać, że nawet jeśli dziecko nie jest nosicielem wadliwej kopii genu, to w przypadku nieleczonej fenyloketonurii u matki, gromadząca się fenyloalanina może doprowadzić do zaburzeń w rozwoju płodu³². Badania na zwierzętach wykazały, że podwyższone poziomy tego aminokwasu mogą powodować stres oksydacyjny i zmiany w metabolizmie komórkowym, które mogą pośrednio prowadzić do procesów zapalnych w obrębie tkanki nerwowej i nasilać degenerację neuronów³³. Innym zaburzeniem metabolicznym, którego występowanie może skutkować zaburzeniem w rozwoju układu nerwowego, jest cukrzyca. Tak jak w przypadku fenyloketonurii, nieleczona cukrzyca, zarówno u dziecka, jak i ciężarnej kobiety, może prowadzić do uszkodzeń OUN i w konsekwencji NDD³⁴⁻³⁶. Co ciekawe, cukrzyca jest również schorzeniem, w przebiegu którego obserwuje się stan zapalny³⁷. Nie jest więc wykluczone, że w niektórych przypadkach zarówno zaburzony metabolizm, jak i chroniczna aktywacja układu odpornościowego prowadzą do rozwinięcia NDD.

Dieta i używki

Najbardziej znanym składnikiem odżywczym kojarzonym z okresem ciąży jest kwas foliowy, inaczej zwany witaminą B9. W organizmie pełni szereg funkcji od regulacji podziałów komórkowych po wspieranie procesów krwiotwórczych^{38,39}. Niedobory kwasu foliowego w okresie prenatalnym mogą skutkować wadami cewy nerwowej, co w konsekwencji może prowadzić do dalszych nieprawidłowości w rozwoju OUN⁴⁰. Innym przykładem składnika odżywczego, którego suplementację zaleca się w okresie ciąży jest jod. Jest to mikroelement niezbędny do poprawnej pracy układu wewnątrzwydzielniczego, a szczególnie pracy tarczycy. Niedobory jodu w okresie ciąży, a także na wczesnym etapie życia mogą prowadzić do obniżenia nastroju, depresji, a także obniżenia funkcji kognitywnych^{41,42}.

Osobną kategorią przyjmowanych substancji, które w ciąży mogą prowadzić do zaburzeń neurorozwojowych są używki lub niektóre leki^{43,44}. Jako przykład można podać spożywanie alkoholu etylowego, które nawet u dorosłych może prowadzić do nieodwracalnych zmian w strukturze mózgu⁴⁵. Nic więc dziwnego, że alkohol przyjmowany w ciąży prowadzi do istotnych zaburzeń w pracy układu nerwowego. Szeroko prowadzone badania nie wykazały bezpiecznej dla płodu dawki alkoholu⁴⁶. Różnice w ilości i częstotliwości spożywania alkoholu w ciąży mogą prowadzić do wystąpienia u potomstwa spektrum objawów określanych jako alkoholowy zespół płodowy (ang. *fetal alcohol syndrome*, FAS). Pacjenci z FAS zmagają się między innymi z zaburzeniami małej motoryki, koordynacji wzrokowo-ruchowej czy z zaburzeniami czucia⁴⁷. Co istotne, używki, takie jak alkohol i tytoń, mogą nasilać stan zapalny poprzez stymulację wytwarzania cytokin prozapalnych oraz zwiększanie stresu oksydacyjnego w organizmie.

Urazy fizyczne i niedotlenienie

Mechaniczne uszkodzenie układu nerwowego, również jest rozpatrywany jako czynnik wpływający na rozwój NDD. Jedynym z najczęściej diagnozowanych zaburzeń neurorozwojowych związanych z uszkodzeniem OUN jest mózgowe porażenie dziecięce. Do objawów tego zaburzenia należy obniżone napięcie mięśniowe, drgawki czy problemy ze słuchem. Uważa się, że częstotliwość tego zaburzenia wynosi nawet 1:500 urodzeń⁴⁸. Jako jeden z czynników wystąpienia mózgowego porażenia dziecięcego wymienia się także niedotlenienie mózgu. Uraz czy niedotlenienie może prowadzić do wystąpienia w OUN stanu zapalnego, a w konsekwencji do dalszych zaburzeń. Skutkiem stanu zapalnego, może być zmiana w rozwijających się połączeniach synaptycznych⁴⁹. Zaburzenia w sieci neuronalnej mogą prowadzić do epileptogenezy i wystąpienia padaczki, która jest często współdiagnozowanym schorzeniem u pacjentów z mózgowym porażeniem dziecięcym⁵⁰.

Urazy psychiczne

Ostatnią, ale nie mniej ważną grupą czynników środowiskowych, które mogą wpłynąć na pojawienie się NDD są traumatyczne wydarzenia i urazy psychiczne doświadczone na wczesnym etapie życia⁵¹. Brak zapewnionej opieki, niezaspokojone potrzeby emocjonalne czy społeczne wywołują nadmierny stres, co szczególnie na wczesnym etapie życia może skutkować nieodwracalnymi zmianami w OUN. Badania prowadzone

na grupie dzieci przebywających w placówkach opiekuńczych wykazały istotne opóźnienia w wystąpieniu kolejnych naturalnych etapów rozwojowych, takich jak pojawienie się mowy czy chodzenie⁵². Uważa się, że mechanizmem stojącym za obserwowanymi zmianami jest nadmierna aktywacja osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA). Aktywność HPA związana jest z uwalnianiem kortyzolu do krwi i aktywacją układu współczulnego w odpowiedzi na stres. Nadmierna i długotrwała aktywność osi HPA może prowadzić do obniżenia odporności, a także rozregulowania fizjologicznej odpowiedzi na bodźce⁵³.

Warto zauważyć, że pomimo różnorodności czynników środowiskowych, wspólnym mianownikiem wielu z nich jest stan zapalny. Zrozumienie mechanizmów prowadzących do zajścia zmian w OUN pod wpływem aktywacji układu odpornościowego wydaje się być istotnym elementem koniecznym do zrozumienia wieloczynnikowych zaburzeń neurorozwojowych.

1.2 Odpowiedź układu odpornościowego

Pierwszym etapem stanu zapalnego jest aktywacja komórek układu odpornościowego m. in.: makrofagów, mastocytów i komórek dendrytycznych. Uwolnione przez nie mediatory prowadzą do wazodylatacji i zwiększenia przepuszczalności śródbłonna. W tym procesie udział biorą m. in. enzymy degradujące macierz zewnątrzkomórkową – metaloproteazy macierzowe (ang. *matrix metalloproteinases*, MMP), w tym MMP-9. Dzięki temu ułatwiona jest migracja komórek żernych do zainfekowanych tkanek. Wraz z neutralizacją zagrożenia (fagocytoza martwych komórek lub patogenów) dochodzi do wyciszenia stanu zapalnego dzięki mediatorom przeciwzapalnym, a następnie do regeneracji tkanki. Przewlekły stan zapalny, wynikający z braku eliminacji bodźca lub rozregulowania mechanizmów wyciszających, może prowadzić do uszkodzenia tkanek i rozwoju chorób przewlekłych. Do mediatorów odpowiedzi odpornościowej należą cząsteczki zarówno promujące, jak i hamujące stan zapalny poprzez propagację sygnału czy wpływ na wzrost i proliferację komórek odpornościowych. Mediatorami stanu zapalnego są cytokiny, wśród których można wyróżnić interleukiny (IL), czynniki martwicy nowotworów (TNF), interferony (IFN) oraz chemokiny (CCL). Główną funkcją tej ostatniej grupy jest wspieranie migracji komórek poprzez chemotaksję. W tabeli 1.1. przedstawiono wybrane cytokiny wraz z przykładami pełnionych funkcji oraz głównym źródłem komórkowym.

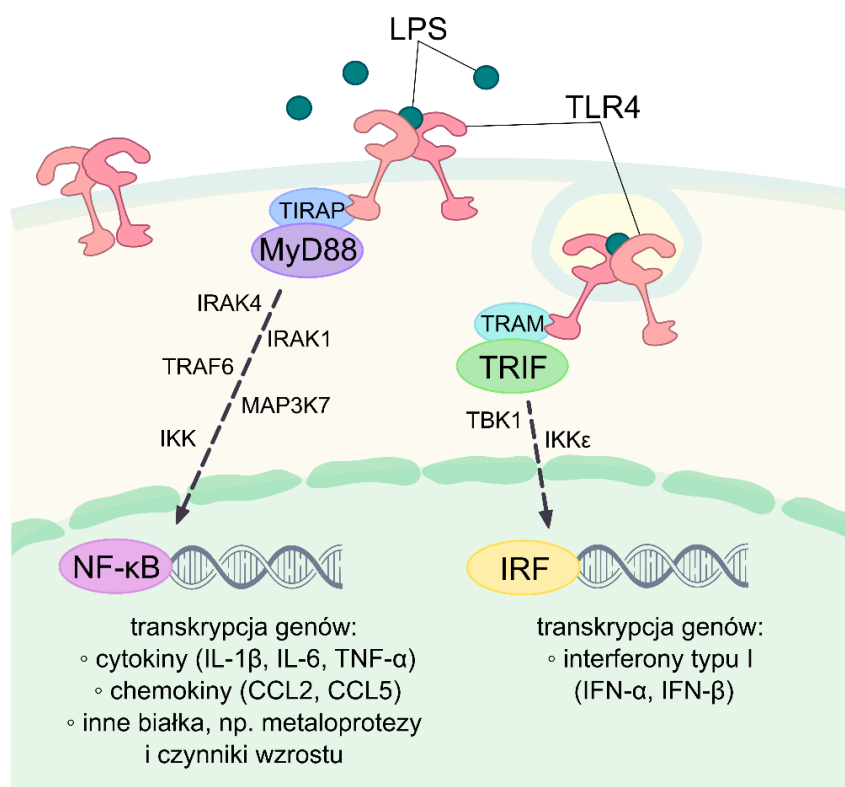
W regulowaniu stanu zapalnego uczestniczą także pochodne kwasu arachidonowego: prostaglandyny i leukotrieny, które sygnalizują OUN rozwój gorączki, obrzęku i bólu. Dodatkowym elementem układu odpornościowego istotnym w regulowaniu reakcji zapalnych są składniki układu dopełniacza. W jego skład wchodzi około 60 różnych białek obecnych w osoczu ułatwiających rozpoznanie i neutralizację patogenów. Obecność tak wielu mediatorów umożliwia stworzenie skutecznego systemu reagowania i obrony przed różnorodnymi czynnikami chorobotwórczymi, zarówno zewnętrznymi, jak i wewnętrznymi.

Tab. 1.1. Wybrane mediatory odpowiedzi układu odpornościowego. W tabeli przedstawiono ich główne źródło komórkowe oraz przykłady funkcji⁵⁴⁻⁵⁷.

Nazwa	Główne źródło komórkowe	Przykład funkcji
IL-1 β	makrofagi	Indukowanie stanu zapalnego, promowanie wazodylatacji
IL-2	limfocyty T	Stymulowanie wzrostu i proliferacji limfocytów T
IL-4	limfocyty T _h	Stymulowanie różnicowania limfocytów B
IL-6	fibroblasty	Promowanie stanu zapalnego, aktywacja limfocytów T
IL-10	aktywne monocyty	Hamowanie uwalniania cytokin prozapalnych, blokowanie prezentacji antygenów
IL-12 p70	monocyty i makrofagi	Aktywowanie limfocytów T i komórek NK, promowanie produkcji interferonów
IL-17	limfocyty T	Wspomaganie procesów krwiotwórczych poprzez mobilizację komórek szpiku kostnego
TNF- α	makrofagi i limfocyty T _h	Regulowanie apoptozy i rekrutacji leukocytów do ognisk zapalnych, promowanie stanu zapalnego
TNFSF12 (ang. <i>TNF Ligand Superfamily Member 12</i> , TWEAK)	monocyty	Regulowanie apoptozy oraz proliferacji komórek w uszkodzonych tkankach
IFN- γ	limfocyty T _c i komórki NK	Aktywowanie makrofagów
CCL5	limfocyty T	Aktywowanie oraz wspieranie migracji limfocytów T przez śródbłonek (wyściółkę naczyń krwionośnych)

Istotnym aspektem sprawnie działającego układu odpornościowego jest rozróżnianie własnych, zdrowych komórek oraz cząsteczek od obcych i potencjalnie

zagrożających czynników. Jest to możliwe dzięki specjalistycznym receptorom rozpoznającym wzorce molekularne (ang. *pattern recognition receptors*, PRR)⁵⁸. Receptory te mogą znajdować się na powierzchni komórek układu odpornościowego (monocytach, makrofagach, komórkach dendrytycznych, komórkach NK) lub w ich wnętrzu, ale także na komórkach śródbłónka. Do najlepiej poznanych PRR należą receptory *toll*-podobne (ang. *toll-like receptor*, TLR), które mogą znajdować się na powierzchni komórek (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) oraz receptory endosomalne wykrywające sfagocytowane patogeny (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9)⁵⁹. TLR4 to receptor powierzchniowy obecny na monocytach, komórkach dendrytycznych, neutrofilach i mastocytach. Jedną z rozpoznawanych przez TLR4 cząsteczek jest lipopolisacharyd (LPS). LPS jest składnikiem budującym zewnętrzną błonę komórkową bakterii gram ujemnych oraz cyjanobakterii⁶⁰. Oprócz LPS do agonistów TLR4 należą: nikiel, opioidy, fibrynogen oraz komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak fragmenty hialuronianu czy niektóre proteoglikany⁶⁰. Przyłączenie się LPS do TLR4 prowadzi do rekrutacji białka MyD88 (ang. *myeloid differentiation primary response 88*) poprzez białko adaptorowe TIRAP (ang. *TIR domain-containing adaptor protein*). Wiązania w tym kompleksie opierają się na domenie wewnątrzkomórkowej TIR^{59,61}. Następnie dochodzi do kaskady fosforylacji regulowanej przez kolejne kinazy: IRAK4 i IRAK1 (kinazy związane z receptorem dla IL 1, ang. *IL-1 receptor-associated kinase*), TRAF6 (czynnik związany z receptorem dla TNF typu 6, ang. *TNF receptor-associated factor 6*), MAP3K7 (kinaza potrójnie aktywowana przez mitogeny, ang. *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7*) oraz kinazę IκB (ang. *IκB kinase*, IKK)^{59,62}. Czynnik transkrypcyjny NF κB (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) znajduje się w cytoplazmie, gdzie jest związany ze swoim inhibitorem – IκB⁶⁰.



Ryc. 1.2. Schemat ścieżek sygnałowych po aktywacji TLR4. Przyłączenie się agonisty np. LPS prowadzi do indukcji ścieżki sygnałowej TLR4-MyD88-NF-κB. Po aktywacji receptora powierzchniowego dochodzi do jego internalizacji i pobudzenia alternatywnej ścieżki sygnałowej TLR4-TRIF-IRF. Przerywanymi strzałkami przedstawiono propagację sygnału na drodze kaskady fosforylacji. Pod ikonami helis DNA podano przykłady białek, których geny ulegają ekspresji pod wpływem wspomnianych ścieżek sygnałowych^{59,60,62,63}.

W wyniku wspomnianej kaskady sygnałowej dochodzi do fosforylacji inhibitora, a odhamowany NF-κB migruje do jądra komórkowego, gdzie aktywuje transkrypcję genów związanych m. in. z odpowiedzią zapalną. Istotnym etapem po aktywacji TLR4 jest jego internalizacja do endosomu⁶³. Dzięki temu możliwe jest aktywowanie alternatywnego szlaku sygnałowego. Do TLR4 znajdującego się w endosomie, poprzez białko adaptorowe TRAM (ang. *TIR domain-containing adaptor molecule*), przyłącza się białko TRIF – cząsteczka adaptorowa z domeną TIR indukująca interferon-β (ang. *TIR domain-containing adaptor inducing interferon-B*)⁶¹. Na drodze fosforylacji przez kinazy TBK1 (Kinaza 1 wiążąca białko TANK ang. *TANK-binding kinase 1*) oraz IKKε dochodzi do migracji czynników regulujących interferony (ang. *interferons regulating factors*, IRF) do jądra komórkowego⁶¹. Tam, jako czynniki transkrypcyjne, doprowadzają do wzrostu ekspresji genów związanych z interferonami typu I⁶¹. Alternatywna ścieżka sygnałowa

związana jest głównie z odpowiedzią przeciwwirusową i propagacją sygnału do pozostałych receptorów endosomalnych np. TLR3. Internalizacja TLR4 jest tylko czasowym zjawiskiem, a receptor może zostać ponownie zrekrutowany do błony komórkowej lub ulec degradacji. Białka produkowane na drodze ścieżki sygnałowej TLR4-MyD88-NF- κ B mogą prowadzić do dalszego rozwoju reakcji odpornościowej i propagowania stanu zapalnego poza zainfekowaną komórkę. Na rycinie 1.2. przedstawiono schemat sygnalizacji komórkowej po aktywacji TLR4 wraz z przykładami białek, których geny ulegają transkrypcji na drodze ścieżki sygnałowej TLR4-MyD88-NF- κ B.

1.2.1 Różnice w odpowiedzi odpornościowej ze względu na płeć

Istotnym czynnikiem modulującym reakcje odpornościowe jest płeć. W organizmach kobiet obserwuje się więcej aktywnych limfocytów T i B w porównaniu do mężczyzn, a oprócz tego limfocyty T wykazują się intensywniejszą proliferacją. U mężczyzn obserwuje się natomiast więcej makrofagów oraz neutrofili, co może być związane z intensywniejszym przechodzeniem stanu zapalnego. Dodatkowo ekspresja genów związanych z TLR jest wyższa w żeńskim organizmie, tak samo jak produkcja przeciwciał przez limfocyty B^{64,65}. Istotną rolę w kontroli stanu zapalnego pełnią geny obecne na chromosomie X związane ze ścieżką NF- κ B np.: *il2rg* (gen kodujący receptor dla IL-2, -4, -7 i -21), *tlr7* czy *foxp3* (gen kodujący skurfinę, białko związane z regulacją i dojrzewaniem limfocytów T)^{66,67}. Co ciekawe, w przebiegu zespołu Klinefeltera (kariotyp 47, XXY) lub Turnera (kariotyp 47, XXX) często współwystępują choroby autoimmunologiczne. Podanie pacjentom testosteronu skutkowało osłabieniem nadmiernych objawów zapalnych⁶⁸. Hormony sterydowe, do których należy testosteron, w dużym stopniu regulują działanie układu odpornościowego. Poziom hormonów płci (androgenów, estrogenów, progesteronu) wzrasta intensywnie w okresie dojrzewania. Główną funkcją tych hormonów jest regulowanie układu rozrodczego, ale oprócz tego mogą wpływać na inne procesy w organizmie, w tym na regulację układu odpornościowego. Działanie hormonów płciowych odbywa się głównie poprzez receptory dla estrogenów (ER) i androgenów (AR)^{67,69,70}. Wyróżnia się dwa główne ER: ER α i ER β . Oba typy są ekspresowane przez komórki układu odpornościowego, np. makrofagi czy komórki dendrytyczne⁶⁷. W populacji limfocytów T obserwuje się wysoką ekspresję genów związanych z ER α , natomiast wśród limfocytów B przeważa typ ER β ⁶⁴. Co ciekawe, poziomy RNA genów *esr1* i *esr2*, kodujących kolejno ER α i ER β nie różniły się znacząco

między limfocytami pobranymi od kobiet i od mężczyzn⁷⁰. Przyłączenie się agonisty do ER może prowadzić do aktywacji czynników transkrypcyjnych, np. NF- κ B czy aktywatorowego czynnika białkowego 1 (ang. *activator protein 1*, AP-1). Sam receptor ER również może migrować do jądra komórkowego, gdzie przyłącza się do elementów odpowiedzi na estrogeny (ang. *estrogen response elements*, ERE) i działa jako czynnik transkrypcyjny^{67,70}. Badanie nad wpływem jednego z estrogenów - estradiolu na komórki układu odpornościowego ujawniły, że efekt zależny jest od stężenia. Przy niskim stężeniu zarówno monocyty i makrofagi wykazywały wysoki poziom ekspresji IL-1, IL-6 oraz TNF, natomiast w obecności wysokich stężeń estradiolu zaobserwowano obniżenie produkcji tych cytokin⁶⁴. Poziomy krążącego estradiolu zmieniają się w trakcie cyklu miesięcznego i istotnie spadają w okresie przekwitania, co może tłumaczyć spadek odporności obserwowany u kobiet w okresie postmenopauzalnym. W przypadku androgenów, głównie testosteronu, wysoki poziom obserwuje się u mężczyzn po okresie dojrzewania. U kobiet stężenia krążących androgenów są zazwyczaj niższe, natomiast w przebiegu niektórych zaburzeń obserwuje się ich wzrost np. w zespole policystycznych jajników⁶⁷. Zaobserwowano, że obecność testosteronu obniża liczbę TLR4 na powierzchni makrofagów, a także redukuje aktywność komórek NK. Uważa się, że androgeny wpływają immunosupresyjnie, a u mężczyzn z niskim poziomem testosteronu obserwuje się większe stężenie cytokin prozapalnych⁶⁴.

Badania na zwierzętach pozwoliły na dokładniejsze zrozumienie mechanizmów wpływających na różnice w odpowiedzi odpornościowej samców i samic. Wykazano, że pomimo niewielkich różnic w ekspresji genów w warunkach fizjologicznych między samcami i samicami, to podanie interferonu prowadziło do wyższej ekspresji genów związanych z odpowiedzią nieswoistą w makrofagach samic⁷¹. Dodatkowo stwierdzono więcej leukocytów w przestrzeni otrzewnej u samic myszy, a komórki te posiadały więcej receptorów TL⁷². Badania na mysim modelu wczesnej aktywacji układu odpornościowego z wykorzystaniem zwierząt MyD88 KO ujawniły, że samce myszy z uszkodzonym genem *myd88* po stymulacji układu odpornościowego wykazywały większy lęk i mniejszą towarzyskość niż samce z grup kontrolnych. U samic efekty te były mniej wyraźne, co stanowi dowód, że działanie istotnego białka w ścieżce sygnałowej TLR4-MyD88-NF- κ B jest zależne od płci⁷³.

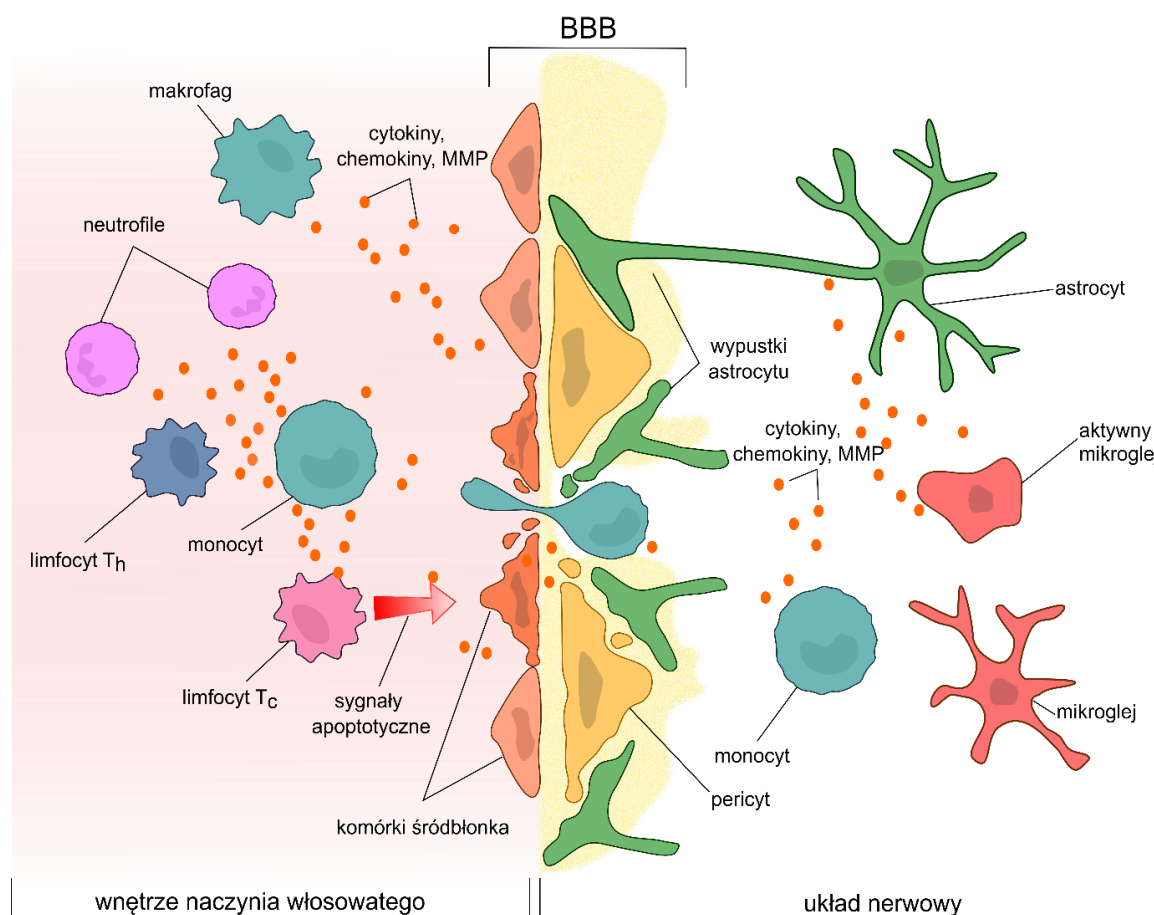
Warto również dodać, że wśród hormonów sterydowych nie tylko te związane bezpośrednio z płcią, wpływają na układ odpornościowy. Kortyzol, a u myszy głównie kortykosteron mają działanie przeciwzapalne⁷⁴. Należą one do hormonów

glukokortykosteroidowych i wytwarzane są przez korę nadnerczy na drodze aktywacji osi HPA, o czym już wspomniano wcześniej. Poprzez przyłączenie się kortykosteronu do receptorów dla glukokortykoidów blokowane jest działanie niektórych czynników transkrypcyjnych, w tym NF- κ B⁶⁹. Kortykosteron zmniejsza także przepuszczalność naczyń krwionośnych i ogranicza migrację leukocytów do miejsc zapalenia, redukując obrzęk i zaczerwienienie⁶⁹. Nadmierne wydzielanie kortykosteronu, np. w reakcji na stres lub w wyniku długich infekcji, może skutkować rozregulowaniem układu odpornościowego, a w konsekwencji zwiększeniem podatności na infekcje⁷⁵. W związku z wymienionymi czynnikami, uważa się, że zarówno odpowiedź odpornościowa swoista i nieswoista jest skuteczniejsza u samic niż u samców⁶⁴. Skutkuje to szybszym zwalczaniem infekcji, a także silniejszym działaniem szczepień wśród kobiet⁶⁵. Wiąże się to niestety także z wyższym prawdopodobieństwem wystąpienia chorób autoimmunologicznych^{64,67}. Co ciekawe, jest to zjawisko obserwowane tylko w dorosłości, ponieważ u dzieci przed okresem dojrzewania, a także u osób starszych silniejsze reakcje odpornościowe obserwuje się wśród mężczyzn⁶⁴.

1.2.2 Stan zapalny w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), rola bariery krew-mózg

Wyjątkową cechą układu nerwowego jest posiadanie tzw. uprzywilejowania immunologicznego. Jest to unikalna właściwość polegająca na obniżonej aktywności układu odpornościowego, w celu ograniczenia potencjalnych uszkodzeń wynikających ze stanu zapalnego. Uprzywilejowanie immunologiczne związane jest między innymi z występowaniem w mózgu charakterystycznych makrofagów rezydujących – mikrogleju. Mikroglej należy do nieneuronalnych komórek OUN i powstaje w pęcherzyku żółtkowym w okresie prenatalnym⁷⁶. Oprócz mikrogleju, specyficznym mechanizmem chroniącym mózgu przed reakcjami zapalnymi toczącymi się poza OUN jest bariera krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB)^{77,78}. Jej rolą jest ograniczenie dostępu toksyn, patogenów, a także komórek odpornościowych do OUN. Oprócz ochrony przed niebezpiecznymi czynnikami, BBB bierze również udział w utrzymaniu równowagi homeostatycznej. W OUN istotnym neuroprzekaźnikiem pobudzającym jest glutaminian, który po przyłączeniu się do swoistych receptorów prowadzi do pobudzenia neuronalnego. We krwi jego poziom intensywnie wzrasta m. in. po posiłku, co przy swobodnym przepływie do mózgu mogłoby skutkować nadmiernym pobudzeniem i neurotoksycznością⁷⁸. Takie zjawisko obserwuje się np. w przebiegu udaru

niedokrwiennego, gdzie dochodzi do nadmiernej przepuszczalności BBB. Schemat procesów prowadzących do rozszczelnienia BBB przedstawiono na rycinie 1.3.



Ryc. 1.3. Schemat rozszczelnienia BBB. Komórki układu odpornościowego przemieszczające się w naczyniach krwionośnych, produkują cytokiny prozapalne, chemokiny oraz enzymy degradujące macierz zewnątrzkomórkową (w tym MMP). Niektóre z cytokin mogą przenikać BBB, aktywując astrocyty, mikroglej oraz pericyty, co przyczynia się do dalszego rozwoju i propagacji stanu zapalnego. Degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej (na rycinie oznaczona jasno-żółtym kolorem), która stabilizuje naczynia krwionośne, w połączeniu z sygnałami apoptotycznymi wysyłanymi przez komórki NK oraz limfocyty T_c , prowadzi do osłabienia struktury BBB. W rezultacie przez barierę mogą przenikać komórki układu odpornościowego, takie jak monocyty, które w ośrodkowym układzie nerwowym przekształcają się w makrofagi rezydujące. Te makrofagi mogą eliminować wypustki neuronalne, przyczyniając się do potencjalnych uszkodzeń neuronów.

Powstawanie BBB rozpoczyna się na wczesnych etapach embriogenezy. Różnicujące się komórki śródbłonna naczyniowego zaczynają tworzyć połączenia ścisłe (ang. *tight junctions*), blokujące swobodny przepływ substancji⁷⁷. Podczas dalszego rozwoju naczyń krwionośnych (angiogenezy), astrocyty oraz pericyty zaczynają oddziaływać z komórkami śródbłonna, tym samym uszczelniając BBB od strony OUN⁷⁷. Pericyty

są niezróżnicowanymi komórkami macierzystymi o pochodzeniu mezenchymalnym. Ich rolą jest kontrola rozwoju naczyń krwionośnych, a na późniejszym etapie ich stabilizacja poprzez produkowanie elementów macierzy zewnątrzkomórkowej⁷⁹. Co istotne, ich właściwości kurczenia się wpływają na tempo przepływu krwi. Pericyty uczestniczą również w procesach regeneracyjnych, wpływając na naprawę uszkodzonych tkanek oraz w odpowiedziach immunologicznych, modulując lokalne stany zapalne⁷⁹. Astrocyty sąsiadujące z naczyniami krwionośnymi oplatają ściśle ściany naczyń swoimi wypustkami. Dzięki temu do OUN mogą przedostawać się substancje odżywcze transportowane z krwią.

W przebiegu silnej lub długotrwałej odpowiedzi odpornościowej, cytokiny prozapalne w tym IL-1 β , IL-6, TNF- α czy IFN- γ mogą przekraczać BBB⁸⁰. Pojawienie się cytokin prozapalnych w OUN prowadzi do aktywowania mikrogleju oraz astrocytów i pericytów do produkcji czynników prozapalnych. Charakterystyczną właściwością mikrogleju jest zmiana jego morfologii pod wpływem aktywacji. Przy czynnikach prozapalnych komórki mikrogleju przyjmują ameboidalny kształt, ułatwiający migrację do ogniska zapalnego, a także fagocytozę zainfekowanych lub martwych komórek⁷⁶. Nieaktywny mikroglej przyjmuje rozgałęziony kształt z wieloma wypustkami⁷⁶. Oprócz rekrutacji nowych komórek i produkcji cytokin, w trakcie stanu zapalnego dochodzi również do wzrostu ekspresji genów związanych z białkami degradującymi macierz, wspomnianą wcześniej grupą enzymów proteolitycznych MMP. Przy takim zjawisku zarówno komórki odpornościowe znajdujące się we krwi, jak i astrocyty, mikroglej oraz pericyty mogą wpływać na osłabienie struktury BBB i jej rozszczelnienie. Wraz ze wzrostem przepuszczalności BBB do OUN mogą przedostawać się monocyty, tak jak ma to miejsce w przypadku innych tkanek w organizmie.

1.3 Zwierzęce modele zaburzeń neurorozwojowych

Pomimo nieustającego rozwoju nauki, dostępu do najnowszych zdobyczy technologicznych i licznych prób stworzenia takich modeli chorób mózgu, które nie wymagałyby wykorzystania zwierząt doświadczalnych, stosowanie zwierzęcych modeli badawczych w neurobiologii zdaje się nie słabnąć. Próba zrozumienia skomplikowanych procesów neurobiologicznych wymaga zastosowania złożonych modeli. Jednym z kluczowych zagadnień w tej dziedzinie są mechanizmy prowadzące do powstawania NDD. Diagnoza tych zaburzeń opiera się głównie na objawach związanych z zachowaniem. Przyczyn zaburzeń neurorozwojowych, jak sugeruje nazwa,

szuka się w okresie rozwoju OUN. Zastosowanie modelu badawczego, który umożliwia śledzenie i manipulację w trakcie rozwoju OUN oraz obserwację behawioralną jest szczególnie istotne. W mysich modelach szeroki wachlarz behawioru oraz stosunkowo krótki okres rozwoju jest ogromną zaletą przy badaniu mechanizmów zaburzeń neurorozwojowych. Szczególnie dogodne są w tym względzie myszy modyfikowane genetycznie, a zwłaszcza takie, u których dokonano uszkodzenia wybranego genu (tzw. nokauty, KO).

Stres, w tym stan zapalny, na wczesnym etapie rozwoju jest wymieniany jako jeden z czynników prowadzących do rozwoju zaburzeń neurorozwojowych^{22,24,51,81}. W zwierzęcych modelach stanu zapalnego najczęściej stosuje się LPS (w celu symulacji infekcji bakteryjnej) lub kwas poliinozyno-policydydylowy (Poly(I:C), modelowanie infekcji wirusowej)⁸². Jak wspomniano wcześniej, LPS jest składnikiem zewnętrznej błony komórkowej bakterii gram ujemnych oraz cyjanobakterii. W zależności od metody oczyszczania, LPS może aktywować nie tylko TLR4, ale także TLR2, który rozpoznaje bakteryjne lipopeptydy^{83,84}. Dzięki tak szerokiemu działaniu możliwe jest odwzorowanie jak najbardziej fizjologicznej odpowiedzi odpornościowej, podczas której aktywowane jest kilka PRR. Wykorzystanie kwasu Poly(I:C), który jest syntetycznym związkiem, prowadzi wyłącznie do aktywacji ścieżki zależnej od TLR3⁸². Dostosowanie odpowiedniej dawki czynnika zapalnego związane jest z materiałą prowadzonych badań. W mysich modelach LPS w niskich dawkach, tj. 0,01-0,1 mg/kg masy ciała (m. c.), używany jest często do wywołania chronicznego, ale łagodnego w przebiegu stanu zapalnego^{85,86}. Średnie dawki (0,1–5 mg/kg m. c.) stosowane są w badaniach nad przebiegiem uogólnionej reakcji zapalnej oraz w doświadczeniach skupiających się na procesach neurozapalnych^{87,88}. Natomiast dawki powyżej 5 mg/kg m. c. uważane są za wysokie i prowadzące u myszy do szoku septycznego, a nawet śmierci^{87,89}. W badaniach z użyciem wczesnej stymulacji układu odpornościowego lub MIA jednorazowe podanie LPS w dawkach prowadzących do zmian w fizjologii lub zachowaniu wahało się od 0,05 mg/kg masy ciała do nawet 2 mg/kg m. c.^{3,90–95}.

Oprócz rodzaju modelowanej infekcji, obserwowany efekt zależny jest także od protokołu (jednorazowego lub wielokrotnego) oraz sposobu podania (np. dootrzewnowego lub dokomorowego). W przypadku modelowania zaburzeń neurorozwojowych kluczowy jest także etap rozwoju OUN, w którym dojdzie do stresu wywołanego stanem zapalnym. Bardzo często wykorzystywanym modelem jest MIA, przeprowadzana w różnych okresach ciąży. W kontekście NDD, warto zauważyć,

że rozwój układu nerwowego kontynuowany jest także po urodzeniu^{96,97}. Ze względu na zachodzące procesy w OUN, u gryzoni wyjątkowo interesujące zdają się być pierwsze dwa tygodnie po urodzeniu. W ciągu pierwszego tygodnia życia w mózgu myszy dochodzi do intensywnej proliferacji i dojrzewania astrocytów (astrogenezy)⁹⁸. Trombospondyny uwalniane przez dojrzewające astrocyty wspierają rozwój i dojrzewanie synaps, a proces ten intensyfikuje się w okolicach siódmego dnia po urodzeniu (P7)^{96,99,100}. W hipokampie myszy po trzech tygodniach od urodzenia liczba synaps osiąga już około 80% liczby synaps występujących w dojrzałym mózgu¹⁰¹. Co więcej, badania na szczurach z wykorzystaniem hybrydyzacji *in situ* wykazały istotny wzrost ekspresji genów kodujących podjednostki receptora N-metylo-D-asparaginianowego (NMDAR) w korze mózgowej oraz hipokampie pomiędzy P1 a P20¹⁰². Receptor NMDA pełni kluczową rolę w powstawaniu i utrzymaniu długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ang. *long-term potentiation*, LTP), zjawiska niezbędnego w procesie uczenia się i pamięci¹⁰³. Oprócz tego, w ciągu pierwszych tygodni po urodzeniu w OUN myszy dochodzi do intensywnej redukcji liczby komórek. W okresie między P6 a P10 w wyniku apoptozy w korze mózgu dochodzi do utraty nawet do 35% komórek^{104,105}. Co ciekawe, proces ten nie dotyczy wszystkich typów komórek w jednakowym stopniu. Na przykład neurony warstwy podkorowej (ang. *subplate neurons*), które m. in. wspierają migrację innych neuronów, czy pierwotne oligodendrocyty (ang. *early-born oligodendrocytes*) są niemal całkowicie eliminowane na tym etapie rozwoju^{104,106}. W przypadku interneuronów czy komórek piramidowych, apoptoza dotyczy jedynie niektórych spośród nich, co uważa się za mechanizm jakościowej kontroli komórek w OUN¹⁰⁴. W ciągu pierwszych dziesięciu dni dochodzi również do 20-krotnego wzrostu liczby komórek mikrogleju w mysim mózgu¹⁰⁷.

Olbrzymim wyzwaniem pozostaje także dobór odpowiednich testów behawioralnych, pozwalających na wspomniane modelowanie objawów poszczególnych NDD. Szczególnie popularną metodą jest test uniesionego labirynt krzyżowy (ang. *elevated plus maze*, EPM). Jest to narzędzie wykorzystywane do oceny lękliwości u zwierząt¹⁰⁸. Aparat składa się z dwóch otwartych i dwóch zamkniętych ramion ułożonych w kształt krzyża umieszczonego na podwyższonej platformie. Zwierzęta wprowadzane do środka labiryntu mogą swobodnie eksplorować ramiona¹⁰⁸. Istotną tego doświadczenia jest zestawienie dwóch sprzecznych impulsów: potrzeby eksploracji oraz unikania niebezpieczeństwa. Myszy wykazujące wyższy poziom lęku preferują zamknięte ramiona, podczas gdy zwiększona eksploracja otwartych przestrzeni wskazuje na obniżenie reakcji lękowych¹⁰⁹. Najczęściej stosowaną miarą lękliwości jest czas spędzony w nieosłoniętych

częściach aparatu, liczba wejść do poszczególnych ramion czy latencja do rozpoczęcia eksploracji¹¹⁰. Różne szczepy zwierząt lub modele genetyczne czy środowiskowe mogą prowadzić do zróżnicowanych wyników w teście EPM¹⁰⁹. W przypadku modeli ASD często obserwuje się podwyższone zachowania lękowe w porównaniu do zwierząt kontrolnych^{111,112}. Podobnie jest w przypadku badanych modeli schizofrenii, gdzie także obserwuje się wyższą lękliwość^{113,114}. Natomiast wśród modeli ADHD np. nokaut transportera dla dopaminy (DAT-KO) testowanie w EPM skutkuje ujawnieniem istotnych cech nadpobudliwości i impulsywności¹¹⁵. Mysie modele ADHD wykazują zwiększoną eksplorację otwartych ramion, co może być związane zarówno z obniżoną lękliwością, jak i deficytami poznawczym prowadzącymi do błędnej interpretacji kontekstu sytuacji^{115,116}. W związku z tym istotne jest rozważenie ograniczeń wybranej metody. Konstrukcja labiryntu może nie w pełni odzwierciedlać złożoność lęku doświadczanego w naturalnych warunkach, a obserwowane zachowanie może wynikać zarówno z emocjonalności, jak i motywacji zwierząt.

W związku ze wspomnianą nadpobudliwością obserwowaną w modelach ADHD, warto także dodać, że test EPM pozwala na pomiar ogólnej aktywności zwierzęcia. Ten parametr może być stosowany zarówno jako pomoc w interpretacji wyników związanych z lękliwością lub jako osobna miara eksploracji¹¹⁷. Niemniej jednak wyciąganie wniosków na temat aktywności zwierzęcia powinno być poparte obserwacją w swobodnym, komfortowym dla zwierzęcia środowisku. Takie możliwości daje zarówno obserwacja w klatce domowej lub zastosowanie zautomatyzowanych aparatów. W genetycznych modelach ASD m. in. nokaut genów *shank3* czy *fmr1* obserwuje się spadek aktywności lokomotorycznej w fazie ciemnej doby, która u myszy jest główną porą czuwania¹¹⁸. Co istotne, w tych modelach zmiany w zachowaniu obserwuje się głównie wśród samców. Myszy z mutacją w genie *cacng2*, kodującym białko regulujące transport receptorów AMPA (związanych z transmisją synaptyczną), znane jako myszy *stargazer*, są powszechnie stosowane w badaniach nad padaczką^{119,120}. Jednak ze względu na zaburzenia w transmisji synaptycznej oraz wyjątkowy fenotyp behawioralny są również cennym modelem do badań nad NDD. Wśród objawów behawioralnych opisano trudności w utrzymaniu równowagi, charakterystyczny objaw patrzenia w górę, od którego wzięła się nazwa (ang. *stargazer* oznacza osobę patrzącą w gwiazdy), nadaktywność oraz kręcenie się w kółko, które jest przykładem zachowań repetytywnych, inaczej stereotypii¹²¹.

Ograniczone, repetytywne wzorce zachowań, zainteresowań lub aktywności są jednym z objawów wymienianych u pacjentów NDD, szczególnie ASD¹. Stereotypie ruchowe

u myszy to powtarzające się, nieefektywne i pozornie bezcelowe ruchy, które mogą występować w wyniku różnych zaburzeń neurologicznych, specyficznych mutacji genetycznych ale także stresu¹²². Przykładem takiego zachowania może być między innymi wspomniane kręcenie się w kółko, intensywne czyszczenie się czy skakanie. Ze względu na możliwość pojawienia się takiego zachowania w reakcji na stres, przy charakteryzowaniu fenotypu badanego modelu istotne zdaje się wykluczenie tego czynnika. Linia myszy BTBR (BTBR T+ tf/J, czyli szczep genetyczny myszy powszechnie stosowany w badaniach nad ASD oraz zaburzeniami zachowania) wykazuje się stereotypiami nie tylko podczas stresowych sytuacji, ale także w klatce domowej¹²³. W modelach związanych z wczesną aktywacją układu odpornościowego również opisuje się występowanie stereotypii ruchowych^{124,125}.

Istotnym aspektem w modelowaniu NDD są też objawy związane z behawiorem socjalnym. Często spotykaną metodą używaną do badania socjalności jest test trójkomorowy. Aparat składa się z podzielonej na trzy części areny oraz klatek do prezentacji bodźców umieszczonych w bocznych komorach¹²⁶. W najczęściej spotykanym protokole tego testu sprawdza się preferencję względem nieznanego osobnika w porównaniu do przedmiotu^{127,128}. Możliwe jest także sprawdzenie pamięci społecznej poprzez pomiar reakcji gryzonia na znanego i nieznanego osobnika¹²⁷. Myszy jako zwierzęta funkcjonujące w stadzie zazwyczaj preferują spędzanie czasu w części aparatu z innym osobnikiem¹²⁸. Istotnym elementem testu trójkomorowego jest okres habituacji. W celu zminimalizowania wpływu stresu na zachowanie badanego zwierzęcia, przed wprowadzeniem bodźców, mysz zazwyczaj umieszcza się w pustym aparacie. Pozwala to na zapoznanie się ze środowiskiem, a także ewentualne wyeliminowanie preferencji związanej z miejscem. Podstawowym parametrem badanym podczas tego testu jest czas spędzany w wybranej części aparatu.

Wraz z postępem technologicznym możliwe jest także zautomatyzowane śledzenie myszy. Stosowanie programów opierających się na uczeniu maszynowym daje możliwość wyekstrahowania konkretnych elementów zachowania, takich jak: ustawienie ciała, węszenie, położenie głowy czy uszu¹²⁹. Wspomniane już genetyczne modele ASD, tj. nokaut genów *shank3* czy *fmr1*, ale także nokaut genu *cntnap2*, w teście trójkomorowym charakteryzują się krótszym czasem spędzanym na kontakcie społecznym^{2,118,130,131}. W mysich modelach schizofrenii oprócz obniżonego zachowania socjalnego opisuje się także deficyty kognitywne związane z problemem w rozróżnieniu znanego i nieznanego osobnika¹¹³.

Warto także dodać, że w naturalnym środowisku dzikie myszy unikają konfrontacji z obcym osobnikiem. Natomiast w celu pozyskania i wymiany informacji wykorzystują bodźce olfaktoryczne np. zapachu moczu¹³². W kontekście modelowania NDD jest to ważna obserwacja ze względu na fakt, że zaburzenia w komunikacji są częstym objawem towarzyszącym np. ASD⁹. Ściółkę pochodzącą z klatki obcych zwierząt jako bodziec niosący informację socjalną zastosowano między innymi w badaniach dotyczących deprivacji sensorycznej¹³³. Zastosowanie ściółki zamiast żywej myszy jako bodźca niesie za sobą także szereg innych korzyści. Test trójkomorowy skupia się na badaniu zachowania jednego osobnika bez możliwości obserwacji i kontrolowania aktywności myszy-bodźca. Pomimo tego, że zwierzę wykorzystywane jako bodziec jest umieszczone w małej klatce ograniczającej swobodę ruchu, możliwe jest prezentowanie emocji np. poprzez stroszenie sierści czy ekspresję pyszczka. W takiej sytuacji ciężko jest odwzorować dokładnie takie same warunki dla każdego z badanych zwierząt w grupie eksperymentalnej. Oprócz tego wykorzystanie ściółki jako bodźca socjalnego może rozwiązać problem wpływu indywidualnych preferencji względem wybranego osobnika, ponieważ pozwala na wymieszanie ściółki pochodzącej od kilku różnych zwierząt.

Przy okazji omawiania obserwacji zwierząt w klatce domowej wspomniano także o klatkach zautomatyzowanych. Oprócz korzyści płynącej z długotrwałej możliwości zbierania danych behawioralnych, czy ograniczania kontaktu z badaczem, takie klatki pozwalają także na śledzenie grupy zwierząt i badanie interakcji między nimi^{126,134,135}. Jednym z takich aparatów jest system Eco-HAB™. Bazuje on na identyfikacji radiowej (ang. *radio-frequency identification*, RFID), co daje możliwość śledzenia pojedynczego zwierzęcia w grupie kilkunastu myszy¹³⁴. System składa się z czterech klatek połączonych tunelami, dzięki czemu myszy mają możliwość spędzania czasu razem, ale także unikania się wzajemnie (dokładny opis klatki Eco-HAB™ przedstawiono w rozdziale 3.). Poza badaniem interakcji w grupie myszy można także prezentować różne bodźce dzięki wbudowanym perforowanym przegrodom. Daje to szerokie pole do analizy struktur społecznych pod wpływem różnych informacji np. przed i po prezentacji ściółki pochodzącej z klatki myszy poddanej procedurze warunkowania strachem (ang. *fear conditioning*). Możliwe jest zastosowanie ściółki od nieznanych zwierząt, tak jak w przypadku testu trójkomorowego. Badania z wykorzystaniem myszy FMR1 KO ujawniły deficyty zarówno w przypadku socjalności w grupie, a także w reakcji na nieznany bodziec¹³⁴. Podobne wyniki uzyskano podczas testowania linii BTBR, gdzie myszy wykazywały się obniżoną socjalnością w grupie oraz niższą preferencją względem

nieznanego zapachu społecznego¹³⁶. Protokół w aparacie Eco-HAB zastosowano także w badaniach nad modelem zaburzeń transmisji synaptycznej z wykorzystaniem myszy o obniżonym poziomie czynnika odpowiedzi na surowicę (ang. *serum response factor*, SRF)¹³⁷. Czynniki ten bierze udział w promowaniu dojrzewania kolców dendrytycznych, a obniżenie jego poziomu metodami genetycznymi po urodzeniu myszy prowadzi do obniżenia zachowania w grupie i względem bodźca socjalnego¹³⁷.

Pomimo ograniczeń w bezpośrednim porównywaniu zachowań myszy i ludzi, nowe techniki badawcze umożliwiają głębsze zrozumienie wzorców behawioralnych obserwowanych u gryzoni. Choć altruizm i inne złożone zdolności emocjonalne były tradycyjnie uznawane za unikalne dla ludzi, współczesne badania pokazują, że myszy wykazują bardziej wyrafinowane zachowania społeczne i emocjonalne niż wcześniej sądzono.

1.4 Metaloproteaza macierzowa 9

Istotnym elementem w przekazywaniu sygnału między komórkami organizmu jest macierz zewnątrzkomórkowa (pozakomórkowa, ang. *extracellular matrix*). W kontekście sygnalizacji w układzie nerwowym powstało nawet pojęcie synapsy poczwórnej, gdzie oprócz zakończeń neuronalnych pre- i post-synaptycznych oraz wypustek astrocytarnych wymienia się macierz zewnątrzkomórkową jako część synapsy¹³⁸. W związku z tym, białka mające wpływ na formę macierzy zewnątrzkomórkowej stanowią interesujący przedmiot badań naukowych. Jedną z grup enzymów proteolitycznych, które są zaangażowane w proces przebudowy macierzy są wspomniane wcześniej MMP, inaczej zwane matryksynami. Należą one do szerszej grupy enzymów – rodziny metzincyn (ang. *metzincins*), które mają charakterystyczną strukturę z domeną wiążącą cynk^{139,140}. Do MMP należy ponad 20 białek, a wszystkie składają się z kilku domen: peptydu sygnałowego, propeptydu, domeny katalitycznej oraz domeny hemopoksynowej^{140,141}. Oprócz tego konkretne MMP charakteryzują się swoistymi domenami, np. żelatynazy (MMP-2 i MMP-9) posiadają dodatkowo trzy powtórzenia domeny fibronektynowej typu II w domenie katalitycznej^{142,143}. Peptyd sygnałowy jest niezbędny do transportu świeżo zsyntezowanego białka do siateczki śródplazmatycznej, gdzie dochodzi do obróbki posttranslacyjnej¹⁴⁴. Oprócz tego MMP mogą tam zostać opłaszczane przez błony lipidowe, w wyniku czego powstaje pęcherzyk transportowy, a enzym jest przygotowany do opuszczenia komórki^{142,144}. MMP są uwalniane w procesie egzocytozy w formie nieaktywnego zymogenu (proenzymu,

pro-MMP), którego centrum aktywne jest zablokowane przez domenę propeptydu wiążącego jon cynku z resztą cysteinową (ang. *cysteine switch*)¹⁴⁴. Większość MMP jest uwalnianych do przestrzeni międzykomórkowej, z wyjątkiem sześciu, które są zakotwiczone w błonie komórkowej (MMP-14; -15; -16; -17; -24; -25)¹⁴⁴. Warto również dodać, że ze względu na masę cząsteczkową MMP (od 28 do 92 kDa), białka te działają zwykle niedaleko miejsca wydzielienia¹³⁹. Do aktywacji MMP niezbędne jest usunięcie propeptydu w celu odsłonięcia centrum aktywnego enzymu. Odbywa się to głównie na drodze procesów proteolitycznych, w których biorą udział inne enzymy, np. inne MMP, plazminy czy tripsyny^{140,144}. Oprócz tego do aktywacji MMP może dojść na drodze destabilizacji wiązania między cysteiną a cynkiem przez niskie pH lub reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) utleniające cysteinę¹³⁹. Dzięki odsłonięciu centrum aktywnego możliwe jest przyłączenie się MMP do substratu i rozcięcie wiązań peptydowych. Poza tym działanie MMP jest regulowane przez grupę czterech strukturalnie podobnych białek: tkankowych inhibitorów metaloproteaz 1-4 (ang. *tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP)¹⁴⁴. TIMP blokują działanie MMP poprzez wiązanie się z domeną katalityczną, co dodatkowo skutkuje zmianami w konformacji MMP, które również utrudniają podjęcie aktywności enzymatycznej¹⁴⁴. Zachowanie równowagi pomiędzy poziomami MMP i TIMP pozwala na utrzymanie balansu pomiędzy degradacją i odbudową macierzy zewnątrzkomórkowej.

Jednym z najczęściej badanych MMP jest białko MMP-9, znane również jako żelatynaza B. Po raz pierwszy MMP-9 opisano w neutrofilach, wiążąc rolę tego białka z odpowiedzią zapalną¹⁴². Badania przez kolejne dekady wykazały, że rola MMP-9 w organizmie jest szeroka i obejmuje zarówno udział w procesach rozwojowych (embriogeneza, angiogeneza), w gojeniu ran, a także w procesach uczenia się i pamięci^{140,141,145–147}. MMP-9 jest wiązane również z wieloma procesami patologicznymi, np. nowotworzeniem czy epileptogenezą, czyli procesem rozwoju padaczki^{49,140,142,148}. Ze względu na budowę, MMP-9 jest jednym z bardziej złożonych enzymów należących do metzincyn. Oprócz podstawowych domen charakterystycznych dla MMP oraz wspomnianych wcześniej powtórzeń fragmentów fibronektynowych, MMP-9 posiada dodatkowo domenę O-glikolizowaną^{141,144}. Stanowi ona łącznik pomiędzy domeną hemopoksynową oraz katalityczną. W formie latentnej masa cząsteczkowa MMP-9 wynosi 92 kDa, natomiast aktywnej 82-88 kDa, w zależności od tego, jakie fragmenty zostaną usunięte w trakcie przekształcenia do formy aktywnej¹⁴⁹. Głównymi czynnikami regulującymi MMP-9, a także inne MMP, są kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny

(ang. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK), które odgrywają kluczową rolę w regulacji odpowiedzi komórki na sygnały zewnętrzne¹⁴². Do MAPK należą cztery grupy: ERK (kinazy związane z zewnętrznymi sygnałami, ang. *extracellular signal-regulated kinases*), kinazy aktywowane stresem (ang. *c-Jun N-terminal kinases*, JNK), grupa białek p38 oraz ERK5 (grupa kinaz aktywowanych zarówno przez stres, jak i czynniki wzrostu)¹⁵⁰. Są one stymulowane przez wiele czynników, m. in. cytokiny, czynniki wzrostu, stres oksydacyjny czy metale ciężkie¹⁵⁰. Kaskada sygnałowa MAPK prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych, takich jak wspomniany wcześniej NF-κB czy AP-1¹⁴⁷. Jak wspomniano wcześniej, MMP, w tym MMP-9, są uwalniane głównie w formie zymogenu. W przypadku MMP-9 usunięcie propeptydu odbywa się przy udziale innych MMP, m. in. MMP-2 oraz MMP-3, a także systemu plazminogen-plazmina^{140,142,151}. Głównym inhibitorem MMP-9 jest TIMP-1¹⁵². Co niespotykane w innych grupach MMP, żelatynazy mają dodatkową właściwość pozwalającą na tworzenie kompleksów zymogen-inhibitor¹⁵³. Dokładne funkcje tych kompleksów, szczególnie w przypadku MMP-9, nie są poznane, ale prawdopodobnie mają również związek z regulacją aktywności MMP-9. Wśród substratów MMP-9, zgodnie z nazwą tego enzymu, są składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak: kolageny (typu IV, V, VII, X), żelatyna i β-dystroglikan^{140,141}. Oprócz tego MMP-9 degradowe niektóre białka adhezyjne (utrzymujące odpowiednie odległości pomiędzy komórkami), np. cząsteczki adhezyjne międzykomórkowe 1 oraz 5 (ang. *intercellular adhesion molecule*, ICAM) i n-kadherinę^{147,154,155}. MMP-9 bierze także udział w cięciu proteolitycznym neurotrofin, białek niezbędnych do funkcjonowania układu nerwowego, np. neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) czy czynnika wzrostu nerwów (*nerve growth factor*, NGF)^{156,157}. W kontekście stanu zapalnego również ciekawa jest aktywność MMP-9 przy uwalnianiu aktywnej formy TNF-α z pro-TNF-α, a także modyfikacja aktywności CCL1 i CCL8¹⁴³.

MMP-9 bierze udział w procesach uczenia się i pamięci poprzez udział w regulowaniu istotnego zjawiska jakim jest plastyczność synaptyczna. Przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej daje możliwość zajścia zmian w strukturze synaps. Dzięki temu możliwe jest tworzenie nowych kolców dendrytycznych oraz ich stabilizacja. Badania wykazały, że MMP-9 jest niezbędna nie tylko do zajścia zmian strukturalnych, ale także funkcjonalnych w obrębie kolca dendrytycznego^{158–160}. Aktywność MMP-9 jest szczególnie istotna w zjawisku LTP, gdzie jej działanie wspomaga reorganizację białek macierzy, ułatwiając zwiększenie wydajności połączeń neuronalnych^{160,161}. Proces LTP

można podzielić na dwie fazy: wczesną oraz późną. Wczesna faza LTP to szybki i krótkotrwały proces, który opiera się na napływie jonów wapnia (Ca^{2+}), dynamicznych modyfikacjach białek poprzez fosforylację, oraz zwiększaniu liczby receptorów AMPA w błonie postsynaptycznej^{159,161}. Procesy te dają fundament do dalszych zmian zachodzących w późnej fazie LTP. Procesie, który obejmuje syntezę nowych białek, przebudowę cytoszkieletu, tworzenie nowych synaps i stabilizację istniejących połączeń¹⁶². Kluczowe mechanizmy, takie jak aktywacja translacji, zmiany w cytoszkielecie i współdziałanie z macierzą zewnątrzkomórkową, utrwalają zmiany synaptyczne, stanowiąc podstawę dla długotrwałego przechowywania informacji i pamięci^{162,163}. Badania na szczurach pozbawionych MMP-9 wykazały, że enzym ten jest niezbędny do zajścia późnej fazy LTP, co stanowi ważny dowód roli tego białka w procesach plastyczności synaptycznej^{160,164}. Wartym wspomnienia jest również fakt, że myszy pozbawione aktywnego białka MMP-9 nie uczą się w warunkach eksperymentalnych z udziałem bodźca nagradzającego¹⁶⁵.

W świetle przedstawionych informacji o MMP-9 nie dziwi więc rola tego białka w patogenezie wielu schorzeń neuropsychiatrycznych^{140,141,166}. Ze względu na temat niniejszej rozprawy szczególną uwagę skupiono na NDD. Badania kliniczne wskazują, że podwyższone poziomy MMP-9 są związane z zaburzeniami poznawczymi i zmianami strukturalnymi w mózgu u osób ze schizofrenią^{140,141,166,167}. Wysoki poziom MMP-9 we krwi został skorelowany z niższą objętością formacji hipokampa^{11,167–169}. Wśród pacjentów z ASD stwierdzono polimorfizmy genu *mmp-9*, a także zaobserwowano wysokie stężenia białka we krwi^{4,170,171}. W NDD nadmierna aktywność MMP-9 może wpływać na rozwój mózgu, szczególnie w kontekście plastyczności synaptycznej i reorganizacji połączeń neuronalnych. Zaburzenia w regulacji MMP-9 mogą prowadzić do nieprawidłowego formowania się synaps, co skutkuje zaburzeniami w komunikacji między neuronami i wpływa na funkcje poznawcze oraz zachowania społeczne. Poprzez regulowanie stanu zapalnego, który występuje u niektórych pacjentów NDD, MMP-9 może nasilać zaburzenia rozwoju mózgu.

Prace nad genetycznym modelem NDD u myszy – nokautem genu *fmr1* – wykazały podwyższony poziom MMP-9 u tych zwierząt¹⁷². Co ciekawe, także w modelach środowiskowych związanych z aktywacją układu odpornościowego zaobserwowano zmiany w stężeniu tego białka¹⁷³. Ważnym dowodem na rolę MMP-9 w powstawaniu zaburzeń w transmisji synaptycznej oraz zmian w zachowaniu są prace na temat farmakologicznego obniżenia poziomów MMP-9. Badania na myszach FMR1 KO

pokazały, że stosowanie inhibitorów MMP-9, np. minocykliny, a także naturalnego inhibitora TIMP-1, prowadziło do poprawy deficytów behawioralnych obserwowanych u tych zwierząt^{112,174,175}. Pomimo dowodów łączących MMP-9, stan zapalny oraz zaburzenia rozwojowe, rola tego białka w patogenezie NDD nie jest do końca poznana.

2. CELE PRACY

Stan zapalny w ciąży i okresie wczesnodziecięcym stanowi czynnik ryzyka późniejszej diagnozy zaburzeń neurorozwojowych. Dokładne mechanizmy wpływu stanu zapalnego na rozwój układu nerwowego nie są jednak poznane. Badania z wykorzystaniem zwierząt skupiają się głównie na okresie prenatalnym, korzystając z modelu aktywacji układu odpornościowego matki (MIA). W związku z tym, że rozwój układu nerwowego zarówno u ludzi, jak i myszy kontynuowany jest po urodzeniu, w niniejszej pracy postanowiono skupić się na okresie postnatalnym. W tym celu postanowiono siedmiodniowe mysie oseski poddać stymulacji układu odpornościowego czynnikiem o pochodzeniu bakteryjnym – LPS – w najniższej dawce (0,05 mg/kg m. c.), której skuteczność wykazano we wcześniejszych badaniach.

Aby scharakteryzować model wczesnej stymulacji układu odpornościowego postanowiono zadać następujące pytania:

1. Czy jednorazowe podanie czynnika bakteryjnego, tj. lipopolisacharydu (LPS), w siódmym dniu życia doprowadzi do zmian w zachowaniu dorosłych zwierząt?
2. Jaki jest przebieg stanu zapalnego u siedmiodniowych myszy?
3. Czy MMP-9 jest modulatorem zmian behawioralnych obserwowanych u dorosłych zwierząt poddanych wczesnej stymulacji układu odpornościowego?

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Zwierzęta wykorzystywane w doświadczeniach

Wszystkie procedury z wykorzystaniem zwierząt wykonano zgodnie z regulacjami prawnymi zawartymi w Ustawie z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych oraz ze zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (numer zgody 973/2020 oraz 1478P2/2023) oraz z zasadami 3R: zastąpienie (ang. *replacement*), ograniczenie (ang. *reduction*) oraz doskonalenie (ang. *refinement*).

3.1.1 Zwierzęta

W doświadczeniach wykorzystano myszy (*Mus musculus*) pochodzące z dwóch równolegle prowadzonych hodowli: (i) szczepu wsobnego C57BL/6J (B6) (Jackson Laboratory, USA) oraz (ii) linii MMP-9 KO (nokaut, ang. *MMP-9 knock-out*) na tle genetycznym C57BL/6J – myszy pozbawione aktywnego białka MMP-9¹⁴⁵.

Myszy linii MMP-9 KO otrzymywano kojarząc ze sobą heterozygotyczne nokauty MMP-9. Dzięki temu uzyskiwano rodzące się w stosunku mendlowskim mutanty homozygotyczne (KO), myszy heterozygotyczne (HET) oraz zwierzęta niezmodyfikowane genetycznie (WT).

3.1.2 Warunki bytowe

Myszy bytowały w pomieszczeniach hodowlanych lub doświadczalnych w zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, w następujących warunkach:

-cykl dobowy: 12 godzin światła/12 godzin ciemności

-temperatura: 22±2 °C,

-wilgotność: 45±5%,

-liczba wymian powietrza: 10-15/h w szafie bytowej lub 40/h w klatkach indywidualnie wentylowanych (ang. *individually ventilated cages, IVC*). Zwierzęta miały dostęp do wody oraz paszy *ad libitum*, a dodatkowo w klatkach umieszczano materiał gniazdowy (włosy drzewne, wałeczki oraz płatki bawełniane) oraz wzbogacenia środowiska w postaci rolek papierowych lub kołków osikowych.

Rodziny hodowlane (dwie samice i jeden samiec) umieszczano na okres trzech dni w IVC. Po tym czasie samca przenoszono do osobnej klatki, natomiast samice ważono co kilka dni w celu potwierdzenia ciąży. Między 13 a 15 dniem ciąży samice rozdzielano i przenoszono do osobnych klatek, aby można było precyzyjnie określić datę porodu.

3.1.3 Identyfikacja genotypu (genotypowanie)

W czternastym dniu po urodzeniu, myszy linii MMP-9 KO oznaczano poprzez obcięcie paliczków, a także pobierano materiał (fragment ogona) w celu identyfikacji genotypu. Do genotypowania wykorzystywano metodę reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR). Do powielania sekwencji DNA stanowiących fragmenty niezmodyfikowanego lub zmodyfikowanego genu MMP-9 zostały użyte startery wymienione w Tabeli 3.1. Procedura przeprowadzana była przez pracowników zakładu inżynierii genetycznej Zwierzętarń Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

Tab. 3.1. Nazwy i sekwencje starterów wykorzystanych do reakcji PCR

Gen	Nazwa startera	Sekwencja startera
<i>mmp-9</i>	1 – specyficzny dla WT	5' – TTA CCG GAG GTG CAA ACT GG– 3'
	2 – specyficzny dla WT	5' – GCA TAC TTG TAC CGC TAT GG– 3'
	3 – specyficzny dla KO	5' – CTC AGA AGA ACT CGT CAA GA– 3'
	4 – specyficzny dla KO	5' – GGA TTG CAC GCA GGT TCT CC– 3'

3.2 Stymulacja układu odpornościowego czynnikiem o pochodzeniu bakteryjnym

W siódmym dniu po urodzeniu (P7) oseski ostrożnie wyciągano z gniazda w celu wykonania dootrzewnowej (ang. *intraperitoneal*, i.p.) iniekcji. Zwierzęta otrzymywały 0,05 mg/kg m. c. bakteryjnego lipopolisacharydu (LPS) z kolonii *Escherichia coli* O55:B5 (L2637, Sigma Aldrich, USA) rozpuszczonego w 30 µl fizjologicznego roztworu soli (NaCl, #08301962, Zakłady Farmaceutyczne Polpharma, Polska). Myszy z grup kontrolnych otrzymywały 30 µl NaCl i.p. Po iniekcji oseski odkładano do gniazda, gdzie przebywały z matką do czasu dalszych procedur. Aby uniknąć dodatkowego stresu

i ryzyka odrzucenia zwierząt przez matkę, oseski na tym etapie nie były oznaczane, a w związku z tym cały miot otrzymywał tę samą substancję.

3.3 Testy behawioralne

Doświadczenia behawioralne przeprowadzono zarówno na myszach B6 oraz zwierzętach pozbawionych aktywnego białka MMP-9 (KO), a także ich niezmienionego genetycznie rodzeństwa (WT). Zwierzęta wykorzystywane w doświadczeniach behawioralnych były oddzielane od matki po 21 dniach od urodzenia. Następnie myszy przenoszono do większych klatek bytowych i trzymano w grupach 12-13 osobników o tej samej płci, genotypie oraz podanej substancji. Przed rozpoczęciem testów behawioralnych zwierzęta przez tydzień były przyzwyczajane do eksperymentatora poprzez wyciąganie z klatki i trzymanie na dłoni przez ok. minutę (ang. *handling*). Testy behawioralne zaplanowano w celu oceny emocjonalności, aktywności oraz socjalności przy jak najmniejszym stresie dla badanych zwierząt. W związku z tym poza klasycznymi, krótkimi testami (obserwacja zwierzęcia w klatce, uniesiony labirynt krzyżowy oraz test trójkomorowy) wykorzystano zautomatyzowane klatki do pomiaru zachowania: Eco-HAB™. Takie narzędzie pozwoliło na długotrwałe i ciągłe śledzenie zachowania pojedynczego zwierzęcia żyjącego w grupie, z ograniczeniem czynników stresujących, takich jak izolacja oraz udział eksperymentatora¹³⁴. Przed wszystkimi testami behawioralnymi zwierzęta habituowano do pomieszczenia, godzinę przy testach klasycznych i trzy dni w przypadku testu w aparacie Eco-HAB™.

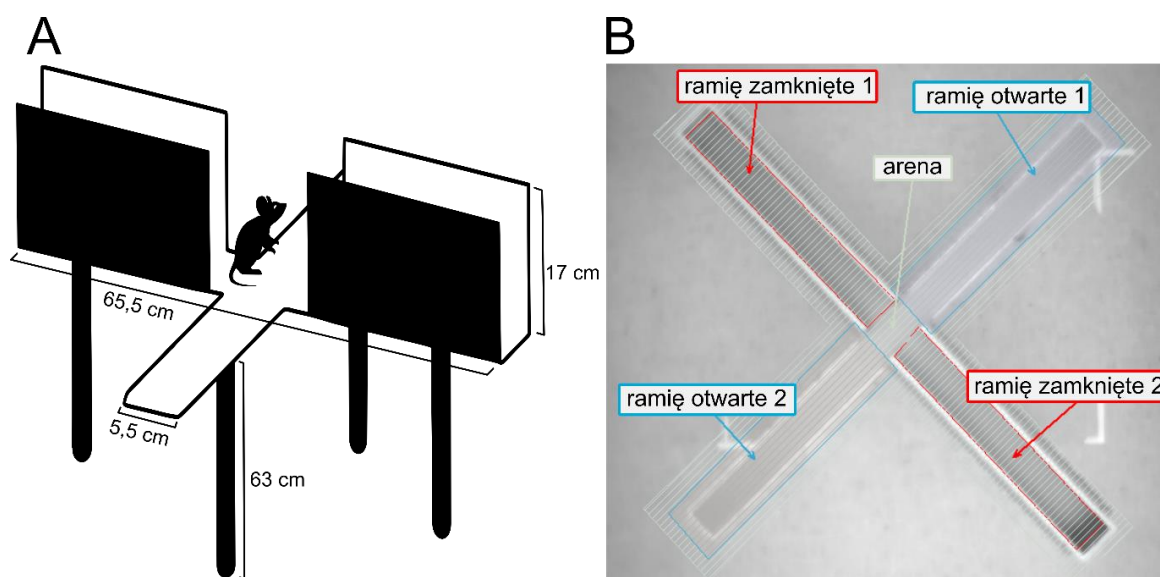
3.3.1 Obserwacja w klatce

Podstawowym, zastosowanym testem behawioralnym była obserwacja myszy w klatce bytowej. Test przeprowadzano na zwierzętach ok. 40-dniowych. Pojedynczą mysz umieszczano w czystej klatce z małą ilością ściółki, w celu ograniczenia kopania. Mysz nagrywano przez 10 minut, a następnie umieszczano ją z powrotem w klatce bytowej. Podczas 10-minutowego testu zliczano łączny czas spędzony na pielęgnacji futerka (ang. *self-grooming*).

3.3.2 Uniesiony labirynt krzyżowy (EPM)

Test uniesionego labiryntu krzyżowego (ang. *elevated plus maze*, EPM) przeprowadzano na zwierzętach około 60-dniowych. EPM zbudowany jest z dwóch ramion zamkniętych (platform ograniczonych ściankami po bokach) oraz dwóch ramion otwartych

(same platformy), umieszczonych 63 cm nad podłogą. Schemat aparatu przedstawiono na rycinie 3.1.



Ryc. 3.1. Uniesiony labirynt krzyżowy. A. Schematyczne przedstawienie aparatu (bez zachowania skali). B. Widok z góry z naniesionymi w programie EthoVision strefami.

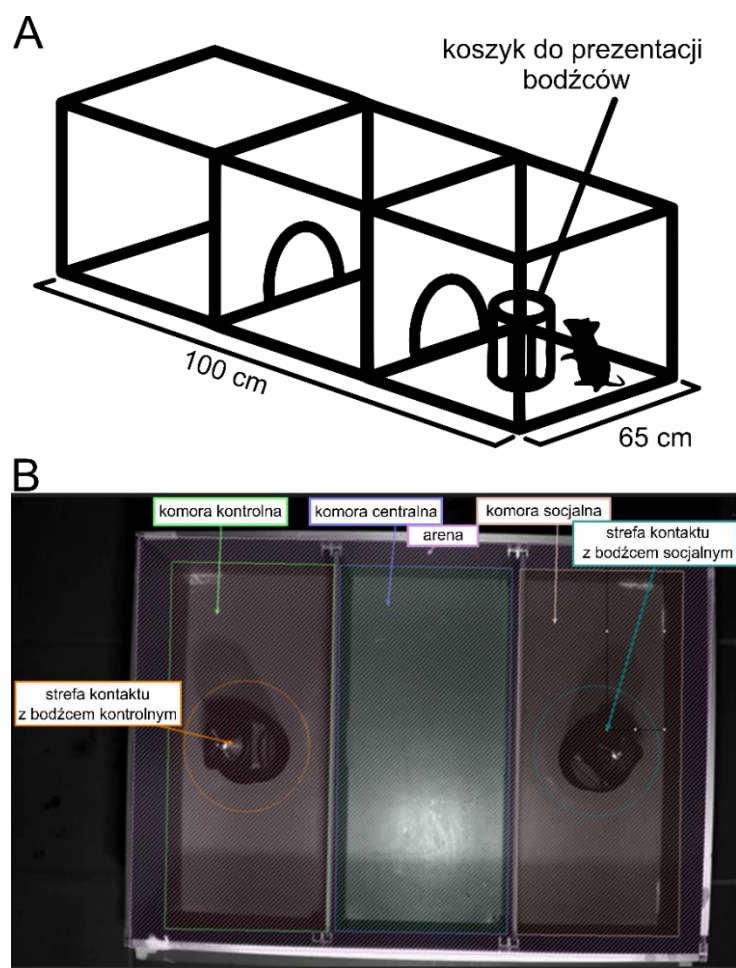
Zwierzę wkładano do labiryntu, głową w kierunku jednego z ramion otwartych i pozostawiano w aparacie na 5 minut¹⁰⁸. Doświadczenie rejestrowano przy użyciu kamery umieszczonej nad labiryntem, a następnie nagrania analizowano przy pomocy programu komputerowego EthoVision XT (Noldus, Holandia).

EPM wykorzystywany jest do pomiaru poziomu lęklivosti u zwierząt i opiera się na naturalnie występującym u gryzoni konflikcie pomiędzy chęcią eksploracji nowego otoczenia a awersją do otwartych przestrzeni i wysokości^{109,110}. Lęklivość wyrażono jako stosunek czasu jaki mysz spędziła w ramionach otwartych („niebezpiecznych”) do czasu spędzonego w ramionach zamkniętych („bezpiecznych”), gdzie wyższa wartość wskazuje na niższy poziom lęku¹⁰⁹. Dla każdej myszy policzono również liczbę wychyleń z otwartych ramion (ang. *unprotected head dips*), gdzie wyższa liczba świadczy o niższej lęklivosti. Dodatkowo, zmierzono czas w jakim zwierzę pozostawało w ruchu podczas doświadczenia.

3.3.3 Test trójkomorowy

Myszy są zwierzętami społecznymi, żyjącymi w grupach ze ściśle określoną hierarchią. Stąd też, stanowią doskonały model do badania zachowania socjalnego¹⁷⁶.

Jednym z najczęściej wykorzystywanych testów do pomiaru socjalności u myszy jest test trójkomorowy zaproponowany w 1982 przez M. Landauera i R. Balstera¹²⁶. Test przeprowadzano w klatce podzielonej na trzy równe części oddzielone przegrodami z otworami pozwalającymi myszy na swobodne poruszanie się po całym aparacie. Dodatkowo, w bocznych komorach umieszczano metalowe, perforowane koszyczki w celu prezentacji różnych bodźców np. znajomego lub obcego osobnika, lub przedmiotu. Schemat zaprezentowano na rycinie 3.2.



Ryc. 3.2. Test trójkomorowy A. Schematyczne przedstawienie klatki (bez zachowania skali). B. Widok z góry z naniesionymi strefami w programie EthoVision.

Doświadczenie składało się z dwóch etapów: habituacji do nowego otoczenia oraz właściwego testu. Zwierzę umieszczano w środkowej komorze, a po okresie habituacji (10 minut), mysz na chwilę wyciągano z aparatu, a w metalowych koszyczkach umieszczono bodźce. Jako bodziec socjalny zastosowano garść ściółki, pochodzącą z klatki nieznanych dla badanej myszy osobników (2-3 myszy o tej samej płci co zwierzę badane), natomiast czystej ściółki użyto jako bodźca kontrolnego. Następnie, ponownie

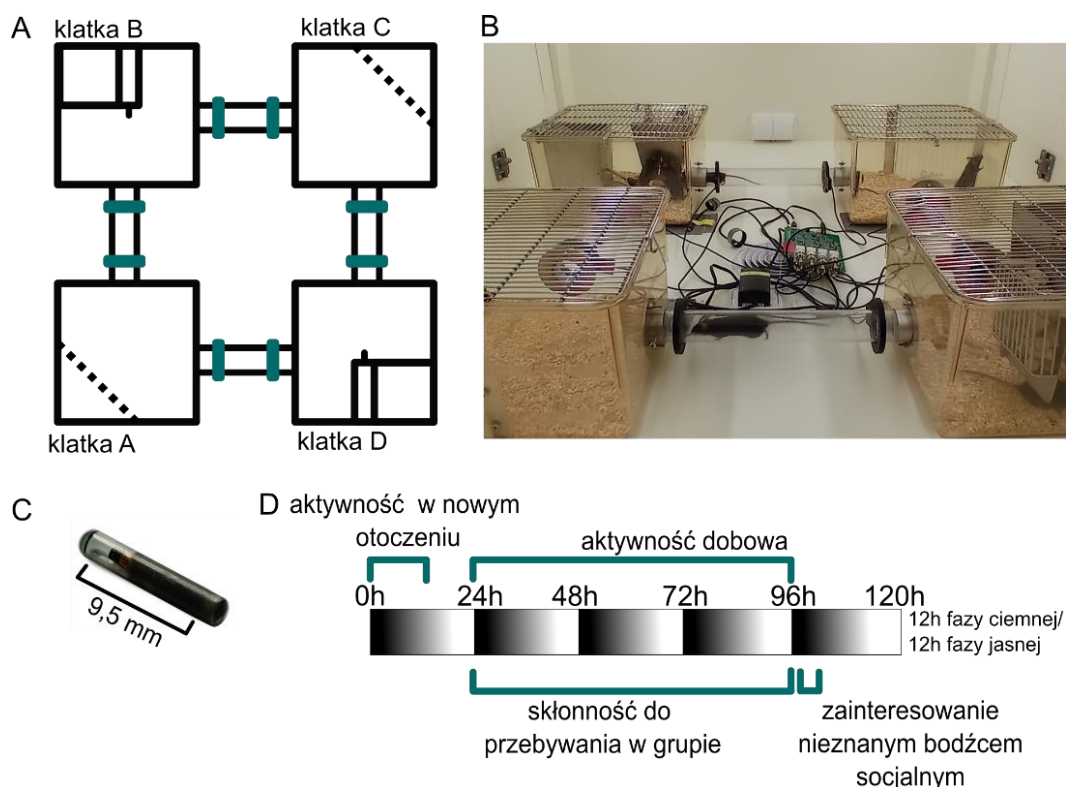
umieszczano mysz w centralnej części klatki i nagrywano jej zachowanie przez 10 minut. Tak jak w przypadku testu EPM, nagrania analizowano przy użyciu oprogramowania EthoVision XT. Jako miarę socjalności zastosowano czas spędzony na kontakcie z bodźcem socjalnym. Jako kontakt zaliczano czas, kiedy głowa myszy znajdowała się blisko koszyczka z bodźcem (obszar o promieniu 4 cm wokół koszyczka).

3.3.4 Test w aparacie Eco-HAB™

Aparat Eco-HAB™ daje możliwość całodobowego śledzenia zachowania pojedynczego zwierzęcia żyjącego w grupie do 16 osobników¹³⁴. Eco-HAB™ złożony jest z czterech klatek domowych połączonych pleksiglasowymi rurkami, służącymi jako tunele, oraz z systemu identyfikacji radiowej (ang. *radio frequency identification*, RFID) połączonego z komputerem. W dwóch klatkach dostępne były pożywienie oraz woda, natomiast dwie pozostałe klatki wyposażono w perforowane przegrody, za którymi można było umieścić bodziec zapachowy. Schemat aparatu zaprezentowano na rycinie 3.3. Doświadczenia w klatce Eco-HAB™ wykonywano na ok. 3-miesięcznych zwierzętach. Trzy dni przed rozpoczęciem eksperymentu, każdej z myszy umieszczono podskórnie identyfikator RFID (mikrotransponder), do którego przypisany był unikalny 15-cyfrowy numer, rozpoznawany przez anteny umieszczone przy wejściach do tuneli. Sygnał odbierany przez anteny był zliczany i zapisywany w formie plików tekstowych w cyklu jednogodzinnym. Każdą grupę zwierząt testowano w odrębnym aparacie.

Protokół doświadczenia składał się z 4 dni swobodnego bytowania (doświadczenie rozpoczęto wraz z początkiem fazy ciemnej), a następnie piątego dnia za perforowanymi przegrodami umieszczano bodźce zapachowe. Jako bodziec socjalny wykorzystano garść ściółki, pochodzącej z klatki nieznanych dla badanych myszy osobników (2-3 myszy o tej samej płci, co grupa badana), a jako bodźca kontrolnego użyto czystej ściółki. Dobę po prezentacji bodźców, doświadczenie zakończono, a myszy wróciły do tradycyjnych klatek bytowych.

W celu ułatwienia analizy po zakończeniu doświadczenia uzyskane pliki tekstowe były procesowane z wykorzystaniem algorytmów opracowanych przez pracowników Pracowni Neurobiologii Emocji oraz Pracowni Neuroinformatyki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie¹³⁴. Dane otrzymane w ten sposób zawierały informacje o liczbie wykonanych wizyt oraz czasie spędzonym w każdej z klatek w różnych zakresach czasowych (od 1 godziny do 24 godzin).



Ryc. 3.3. Aparat Eco-HAB™. **A.** Schemat aparatu, na turkusowo zaznaczono anteny RFID zamontowane na rurkach łączących kolejne klatki. W klatkach B i D umieszczono poidła z wodą i pożywienie, natomiast w klatkach A i C znajdowały się perforowane przegrody, za którymi umieszczano bodźce. **B.** Myszy w aparacie Eco-HAB™. **C.** Szklany mikrotransponder umieszczany pod skórą zwierząt. **D.** Schemat doświadczenia i mierzone parametry.

Zmierzone parametry w aparacie Eco-HAB™:

- Eksploracja nowej klatki - dla każdej z myszy zsumowano liczbę wykonanych wizyt we wszystkich czterech klatkach aparatu w ciągu 6 kolejnych godzin od rozpoczęcia eksperymentu. Następnie, wartości naniesiono na wykres, gdzie na osi Y umieszczono liczbę wizyt, a na osi X kolejne godziny od włożenia myszy do klatki. Dalej, dla każdego z osobników wyznaczano krzywą łączącą punkty i wyliczono pole powierzchni pod krzywą (ang. *area under the curve*, AUC), korzystając z wbudowanej funkcji programu GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, USA). Wyższa wartość AUC stanowiła o intensywniejszej eksploracji nowej klatki.
- Aktywność dobowa - w aparacie Eco-HAB™, tak jak w klatkach bytowych, zachowano 12-godzinny cykl dobowy, dzięki temu możliwa była analiza aktywności w cyklu dobowym myszy. Dla każdego zwierzęcia obliczono liczbę

wizyt wykonanych w kolejnych fazach jasnych i ciemnych, pomiędzy dniem 2 a 4 eksperymentu. Następnie, na podstawie punktów (Y: liczba wizyt, X: czas) wyznaczono krzywe i obliczono AUC. Wyższa wartość AUC stanowiła o wyższej aktywności.

- Zainteresowanie nieznanym bodźcem socjalnym – wyrażano jako stosunek czasu spędzonego w klatce z bodźcem socjalnym (Ts) do czasu spędzonego w klatce z bodźcem kontrolnym (Tk) w ciągu pierwszej godziny po prezentacji bodźców. Chcąc zminimalizować efekt preferencji miejsca, otrzymaną wartość podzielono przez stosunek czasu jaki zwierzę spędziło dobę wcześniej w klatkach z perforowanymi przegrodami (ts i tk). Parametr zainteresowanie nieznanym bodźcem socjalnym można więc przedstawić jako:

$$\frac{T_s/T_k}{t_s/t_k}$$

Wynik następnie logarytmizowano, a wartości dodatnie stanowiły o preferencji bodźca socjalnego, natomiast wartości ujemne o awersji względem tego bodźca¹³⁴. Z analizy usunięto dane, jeśli którakolwiek ze zmiennych (Ts, Tk, ts, tk) wynosiła 0.

- Skłonność do przebywania w grupie – w celu wyznaczenia tego parametru, dla każdej pary myszy (np. mysz A i B) obliczono czas spędzony wspólnie pomiędzy drugim a czwartym dniem doświadczenia (t_{AB}), dodatkowo dla każdego ze zwierząt obliczono czas spędzony w każdej z klatek w tym okresie (t_{A1} , t_{A2} , t_{A3} , t_{A4} , t_{B1} , t_{B2} , t_{B3} , t_{B4}). Każdy z wyników znormalizowano przez całkowity czas analizowanego przedziału (259200 s), tak aby wartości znajdowały się w zakresie od 0 do 1. Następnie, aby wyznaczyć skłonność do przebywania w grupie, od wspólnie spędzonego czasu odjęto czas, jaki zwierzęta spędziłyby razem, zakładając niezależne eksplorowanie aparatu, co można wyrazić jako:

$$\Delta t = t_{AB} - (t_{A1} * t_{B1} + t_{A2} * t_{B2} + t_{A3} * t_{B3} + t_{A4} * t_{B4})$$

Następnie na podstawie wyników uzyskanych dla każdej pary myszy, obliczono średnią dla każdego zwierzęcia. Dane dla par przedstawiono na mapach ciepła, natomiast analizę statystyczną wykonano na średnich wartościach dla każdej myszy.

Wzory użyte do wyznaczenia parametrów socjalność oraz socjalność w grupie opracowano w Pracowni Neurobiologii Emocji oraz Pracowni Neuroinformatyki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie¹³⁴.

3.4 Metody biologii molekularnej

Doświadczenia molekularne przeprowadzono na tkankach pobranych do 24 godzin po stymulacji układu odpornościowego siedmiodniowych myszy szczepu B6.

3.4.1 Podstawowe odczynniki chemiczne

Najczęściej stosowane odczynniki chemiczne wykorzystywane w niniejszej rozprawie zaprezentowano w tabeli 3.2.

Tab. 3.2. Wybrane odczynniki chemiczne

Nazwa	Producent, numer katalogowy
akryloamid: bis akryloamid; 29:1	BioShop, Kanada, ACR009.500
alkohol etylowy	Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska, 396420113
alkohol metylowy	Sigma Aldrich, USA, 32212-1L
azydek sodu - NaN_3	Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska, 792770426
błękit Coomassie	Sigma Aldrich, USA, 27816-25g
bufor do radioimmunoprecypitacji (ang. <i>radio-immunoprecipitation assay</i> , RIPA)	Sigma Aldrich, USA, R0278-50ML
bufor obciążający laemmliego	Bio-Rad, USA, #1610747
chlorek cynku - ZnCl_2	Sigma Aldrich, USA, 208086-500G
chlorek wapnia - CaCl_2	Bioshop, Kanada, CCL444.500
cOmplete™ - koktajl inhibitorów proteaz bez EDTA	Roche, Szwajcaria, 04693132001
kwas octowy	Sigma Aldrich, USA, 33209

laurylosiarczan sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS)	Bioshop, Kanada SDS001.1
nadsiarczan amonu (ang. <i>ammonium persulfate</i> , APS)	Sigma Aldrich, USA, A6761
Odczynnik Bradforda	BioShop, Kanada, BRA222.1
PhosSTOP™ - koktajl inhibitorów fosfataz	Roche, Szwajcaria, 04906837001
TEMED	BioShop, Kanada, TEM001.50
TRIS - tris(hydroksymetylo)aminometan	BioShop, Kanada TRS001.5
Triton X-100	Sigma Aldrich (Merck), Niemcy, P9416
Tween 20	Sigma Aldrich (Merck), Niemcy, T8787
żelatyna	Fluka Analytical, Szwajcaria, 48723-500G-F

3.4.2 Zestawy komercyjne

Gotowe zestawy zaprezentowane w tabeli 3.3. wykorzystano do metod: multipleksowego testu immunoenzymatycznego - Luminex® oraz do ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR).

Tab. 3.3. Stosowane zestawy komercyjne

Nazwa	Producent, numer katalogowy
Mouse Magnetic Premixed Multiplex Luminex® Assay	Invitrogen, R&D Systems, USA, LXSAMSM-15
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen, Niemcy, 74804
SuperScript™ IV VILO™ Master Mix with ezDNase™	Thermo Fisher Scientific, USA, 11766050
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	Thermo Fisher Scientific, USA, 4444963

3.4.3 Roztwory i bufony

Większość roztworów przygotowywano w wodzie ultraczystej Milli-Q (Merck, Millipore, Niemcy). Najczęściej stosowane roztwory i ich składy zaprezentowano w tabeli 3.4.

Tab. 3.4. Najczęściej stosowane roztwory i bufony

Nazwa	Skład
Bufor do izolacji białek	RIPA, 1x inhibitory proteaz, 1x inhibitory fosfataz
Bufor do rozdzielania elektroforetycznego białek	0,025 M TRIS, 0,192 M glicyna, 0,1% SDS
Bufor do wywołania zymografii żelowej	0,05 M TRIS-HCL pH 7,5 1% TRITON, 0,01 M CaCl ₂ , 0,02% NaN ₃ , 1 μM ZnCl ₂
Roztwór błękitu Coomassie	0,25% błękitu Coomassie, 45% alkohol metylowy, 10% kwas octowy
Roztwór odbarwiający	40% alkohol metylowy, 10% kwas octowy

3.4.4 Pobieranie i utrwalanie tkanek

W wybranych punktach czasowych, tj. 0,5 godz., 2, 6 lub 24 godziny po podaniu LPS lub roztworu fizjologicznego soli, myszy zostały poddane anestezji wziewnej przy użyciu izofluranu (Aerrane, Baxter, USA) i eutanazji za pomocą pentobarbitalu sodu w dawce 100 mg/kg masy ciała (Morbital®, Biowet, Polska).

W celu pozyskania surowicy oseski skrwawiano poprzez nacięcie tętnicy szyjnej, a krew zbierano sterylną strzykawką. Zebrane próbki przechowywano w lodówce 24 godziny i po tym czasie wirowano 20 minut, w temp. 4°C, z prędkością 1000 G (wirówka 5424 R, Eppendorf, Niemcy). Supernatant zbierano i przechowywano w -80°C do czasu dalszych analiz.

Mózgi izolowano na lodzie i w zależności od przeznaczenia traktowano w dwojaki sposób. Tkanę przeznaczoną do analizy metodą RT-qPCR od razu po dysekcji umieszczano w buforze zabezpieczającym przed degradacją RNA (RNAlater™ Stabilization Solution, Thermo Fisher Scientific, USA) i przechowywano w 4°C do czasu

dalszych procedur. Mózgi przeznaczone do analizy metodą zymografii żelowej poddawano dyssekcji i izolowano przednie części kory mózgu oraz hipokampy. Tkankę umieszczano w pudełku z suchym lodem (zestalony dwutlenek węgla), a po zamrożeniu próbki przechowywano w -80°C.

3.4.5 Metody pracy z białkami

3.4.5.1 Izolacja i pomiar stężenia białka

Zamrożone próbki kory mózgu oraz hipokampów homogenizowano 10 s przy użyciu homogenizatora nożycowego (ULTRA-TURRAX T8, IKA-Werke GmbH & CO, Niemcy) w 150 µl buforu do izolacji białka. Następnie próbki inkubowano na lodzie przez 0,5 godz., a po tym czasie wirowano 15 min, w 4°C, z prędkością 15000 G (wirówka 5424 R, Eppendorf, Niemcy). Supernatant przenoszono do czystych próbek.

W celu oznaczenia stężenia białka w próbce stosowano metodę Bradforda z wykorzystaniem błękitu Coomassie, który po połączeniu z białkami tworzy barwny związek. Wcześniej przygotowano standardy białkowe (Surowicza albumina wołowa, BSA, Thermo Fisher Scientific, USA) o stężeniu od 25 µg/ml do 2000 µg/ml. Na 96-dołkową płytkę o płaskim dnie optycznym (Greiner Bio-One, Austria) nakładano w tryplikacie po 4 µl standardów oraz próbek, a następnie do każdego dołka dodawano 200 µl odczynnika Bradforda. Niezwłocznie dokonywano odczytu spektrofotometrycznego przy użyciu czytnika Infinite® M1000 (Tecan; Szwajcaria). Mierzono absorbancję światła przy długości fali 595 nm, w temperaturze pokojowej (ang. *room temperature*, RT). Ze względu na pomiar w tryplikacie, dla każdej próbki obliczano średnią wartość absorbancji. Na podstawie średnich dla standardów wyznaczono krzywą wzorcową oraz wzór dla krzywej. Następnie korzystając z otrzymanego wzoru obliczono stężenie białka w każdej z badanych próbek.

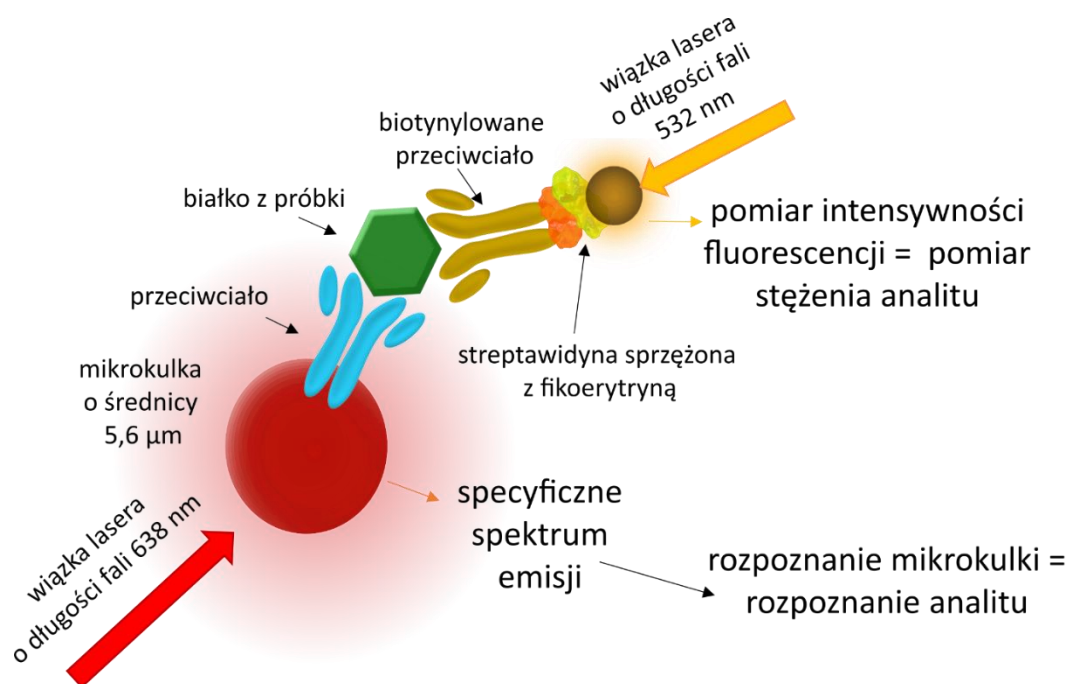
3.4.5.2 Multipleksowy test immunoenzymatyczny - Luminex®

Aby scharakteryzować przebieg stanu zapalnego u siedmiodniowych myszy, zbadano surowicę 0,5; 2; 6 oraz 24 godziny po podaniu LPS lub fizjologicznego roztworu soli. W tym celu zastosowano multipleksowy test immunoenzymatyczny Luminex®. Użycie tej techniki pozwoliło na równoczesne wyznaczenie w badanej próbce wielu białek, co w przypadku ograniczonej ilości materiału stanowiło przewagę nad innymi popularnymi metodami np. tradycyjnym testem immunoenzymatycznym (ang.

enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Na podstawie danych literaturowych wytypowano panel białek związanych z odpowiedzią układu odpornościowego na czynnik pochodzenia bakteryjnego: CCL5, IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-17, MMP-9, TIMP-1, TWEAK, IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-12 p70, MMP-2, TNF- α ^{62,173,177–179}.

Metoda Luminex® łączy w sobie technologię cytometrii przepływowej oraz reakcji immunoenzymatycznych. Opiera się na zastosowaniu magnetycznych mikrokulek wypełnionych dwoma fluoroformami zmieszanymi w różnych stężeniach, co pozwala na uzyskanie aż 100 wariantów mikrokulek (po 10 różnych stężeniach każdego z fluoroforów). Wypełnione fluoroformami mikrokulki są następnie opłaszczane przeciwciałami specyficznymi dla danego białka. W celu oznaczenia wyżej wymienionego panelu białek, zamówiono spersonalizowany zestaw zawierający bufony, standardy białek, przeciwciała oraz mikrokulki (LXSAMSM-15). Ze względu na badanie różnych analitów, przed przystąpieniem do właściwego protokołu, każda próbka została rozcieńczona w stosunku 1:2, 1:50 oraz 1:200. Przygotowano również bufony oraz standardy białek zgodnie z zaleceniami producenta. Procedurę przeprowadzano w 200 μ l studzienkach 96-dołkowej płytki o czarnym zabarwieniu. Do studzienek nakładano po 50 μ l standardów oraz próbek w duplikacie, następnie do każdego dołka dodawano 50 μ l mieszaniny mikrokulek. Kolejnym krokiem była 2-godzinna inkubacja połączona z wytrząsaniem na wytrząsarce orbitalnej (800 rpm) w RT. W tym czasie białka zawarte w próbce przyłączały się do swoistych przeciwciał dostępnych na powierzchni mikrokulek. Następnie płytkę umieszczano na specjalnie do tego przygotowanym magnetycznym bloczku. Dzięki temu mikrokulki przyciągane przez bloczek opadały na dno i możliwe było 3-krotne przepłukanie każdej studzienki 100 μ l buforu płuczącego. Kolejnym krokiem było dodanie do dołków po 50 μ l wcześniej przygotowanej mieszaniny biotynylowanych przeciwciał i inkubacja przez godzinę na wytrząsarce w takich samych warunkach jak wcześniej. Po inkubacji, ponownie stosując magnetyczny bloczek, zabezpieczono mikrokulki na czas 3-krotnego płukania. Kolejno dodano 50 μ l streptawidyny skoniugowanej z fikoerytryną (PE) – białkiem czerwonej fluorescencji, a następnie po 30-minutowej inkubacji na wytrząsarce ponownie wypłukano dołki. W ostatnim kroku mikrokulki wraz z utworzonymi kompleksami przeciwciał zawieszono w 100 μ l buforu płuczącego i dokonano odczytu fluorescencji używając do tego czytnika MAGPIX® System (The BioPlex MAGPIX Multiplex Reader, Bio-Rad, USA). Czytnik bazuje na technologii przepływu, sortowania oraz detekcji przy użyciu dwóch laserów. Jeden laser o długości fali światła 621 nm wzbudza fluorofory wypełniające mikrokulki i dzięki specyficznej emisji

określa jej rodzaj, a w konsekwencji, wykrywa analit. Drugi laser o długości fali światła 511 nm wzbudza PE, a intensywność emisji jest proporcjonalna do ilości związanego białka. Schemat wytworzonego podczas procedury kompleksu białek i przeciwciał przedstawiono na rycinie 3.4.



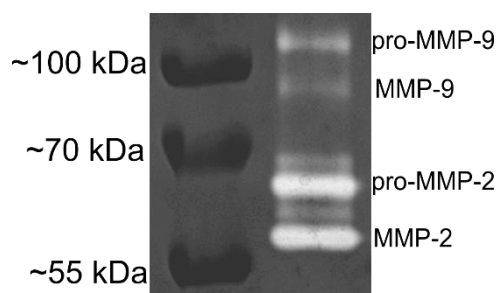
Ryc. 3.4. Schematyczne przedstawienie kompleksu białko-przeciwciało-fluorofor wytworzone podczas multipleksowego testu immunoenzymatycznego Luminex®

Dla każdego z analitów, na podstawie pomiarów intensywności fluorescencji znanych stężeń standardów, wyznaczono krzywą wzorcową oraz wzór dla tej krzywej. Stosując wzór obliczono stężenia badanych analitów dla każdej próbki. Wyniki zaprezentowano wyłącznie dla analitów, które udało się wykryć w badanych próbkach.

3.4.5.3 Zymografia żelowa

Metodę zymografii żelowej zastosowano aby ocenić aktywność żelatynolityczną w przednich częściach kory mózgu oraz hipokampach, 2 i 6 godzin po podaniu LPS lub NaCl. W tym celu przeprowadzono rozdział elektroforetyczny wyizolowanych wcześniej białek. Do przeprowadzenia elektroforezy stosowano żele nieciągłe, składające się z dwóch warstw: zagęszczającej (5% akryloamid: bis-akryloamid; 0,125M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS) oraz rozdzielającej (2 mg/ml żelatyny, 8% akryloamid: bis-akryloamid; 0,5M TRIS-HCl pH 8,8; 0,1% SDS). Polimeryzację indukowano poprzez dodanie 0,05% APS

i katalizatora 0,1% TEMED. Elektroforezę prowadzono w buforze do elektroforezy, w temperaturze pokojowej, przy stałym napięciu 90 V dla żelu zagęszczającego oraz 130 V dla żelu rozdzielającego. Na żele nakładano równe ilości próbek, tj. 10 µg białka w 20 µl 1x stężonego buforu Laemmli. W celu określenia ciężarów cząsteczkowych stosowano barwione standardy mas cząsteczkowych PageRuler Prestained Protein Ladder (#26616; Thermo Fisher Scientific, USA) o zakresie 10-250 kDa. Po przeprowadzonej elektroforezie, żełe dwukrotnie przepłukiwano przez 30 minut w 2,5% roztworze TRITON-u. Następnie, żełe inkubowano przez siedem dni w buforze do wywoływania zymografii w 37°C. Po tygodniowej inkubacji, żełe barwiono 0,25% roztworem błękitu Coomassie, a w celu pozbycia się nadmiaru barwnika płukano w roztworze odbarwiającym oraz wodzie destylowanej. W związku z obecnością w żelu rozdzielającym żelatyny, czyli substratu dla MMP-2 oraz MMP-9, miejsca aktywności żelatynolitycznej były widoczne jako przejaśnienia. Przykładowy zymogram zaprezentowano na rycinie 3.5.



Ryc. 3.5. Przykładowy zymogram. Na żel nałożono 5 µg lizatu białkowego wyizolowanego z ogona pobranego od siedmiodniowej myszy. Z lewej strony widoczne są prążki standardów mas cząsteczkowych, a z prawej strony przejaśnienia w żelu związane z aktywnością enzymatyczną żelatynaz.

Zdjęcia żeli wykonano przy użyciu aparatu ChemiDoc MP (Bio-Rad, USA), a następnie analizowano przy pomocy oprogramowania Image Lab 6.1 (Bio-Rad, USA). Pomiar gęstości optycznej prążków na wysokości badanego białka normalizowano do całkowitego stężenia białka w paśmie (ang. *lane*) oraz względem grupy kontrolnej.

3.4.6 Metody pracy z materiałem genetycznym

3.4.6.1 Izolacja i pomiar stężenia RNA

Mózgi przechowywane w buforze stabilizującym RNA poddano dysekcji pod binokulem. Wyizolowano: przednie części kory mózgowej, prążkowie, hipokampy,

wzgórza, podwzgórza oraz mózdzki. Do izolacji RNA użyto komercyjnego zestawu RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Niemcy). Próbkę homogenizowano około 30 sekund, w 0,5 ml buforu do lizy na bazie fenolu i guanidyny, następnie po 5 minutach inkubacji do probówek dodano 200 µl chloroformu i intensywnie wytrząsano. Po 2-3 minutach wirowano 15 minut, w 4°C, z prędkością 15000 G. Górną fazę (ok. 600 µl) przenoszono do nowych probówek, dodawano równą objętość 70% etanolu oraz dokładnie mieszano używając wytrząsarki typu wortex. Próbkę nanoszono na kolumny dostarczone wraz z zestawem i wirowano 15 sekund, w RT, z prędkością 8000 G. Następnie kolumny przepłukiwano buforem 700 µl RW1 i wirowano używając parametrów takich jak w poprzednim kroku. Kolejnym krokiem było podwójne przepłukanie kolumny 500 µl buforu RPE i wirowanie, najpierw przez 15 sekund, a przy drugim płukaniu przez 2 minuty w RT z prędkością 8000 G. Ostatnim krokiem było eluowanie zatrzymanego na kolumnie RNA, w tym celu na membranę nakładano 50 µl wody wolnej od rybonukleaz i wirowano przez 1 min, z prędkością 8000 G.

Stężenie kwasów nukleinowych w próbce mierzono przy użyciu spektrofotometru do pomiaru mikroobjętości (NanoDrop™ 2000, Eppendorf, Niemcy) przy długości fali równej 260 nm i 280 nm. Następnie, obliczano stosunek absorbancji przy 260 nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}), a wartości współczynnika mieszczące się w zakresie 2,0 - 2,2 uznawano za dowód wysokiego stopnia czystości badanych próbek.

3.4.6.2 Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR)

Aby określić czy i w jakich strukturach mózgu doszło do zmiany ekspresji genów po podaniu LPS zastosowano metodę RT-qPCR. Technika ta pozwala na wykrycie i oznaczenie RNA w badanej próbce. Zdecydowano się na zmierzenie poziomu ekspresji genów *il-6*, *tnf-α*, *mmp-9*. Jako genu referencyjnego użyto *gapdh*, czyli genu dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, który ulega konstytutywnej ekspresji. Zastosowano procedurę dwuetapową, co oznacza że reakcję odwrotnej transkrypcji oraz reakcję PCR przeprowadzono w dwóch osobnych procedurach. W pierwszej kolejności konieczne było przepisanie mRNA na komplementarne DNA (cDNA) w reakcji odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem M-MuLV rewertazy (genetycznie zmodyfikowana odwrotna transkryptaza mysiego retrowirusa). Do tego etapu użyto komercyjnego zestawu SuperScript™ IV VILO™ Master Mix z dodatkowym krokiem oczyszczającym próbkę z genomowego DNA (gDNA). Na lodzie przygotowano próbki zgodnie z tabelą 3.5.

Tab. 3.5 Skład mieszaniny do przeprowadzenia jednej reakcji trawienia gDNA

Składnik	Objętość
bufor ezDNase™ 10x stężony	1 µl
enzym ezDNase™	1 µl
1 µg RNA w wodzie wolnej od nukleaz	8 µl

Trawienie gDNA przeprowadzano w 37°C przez 2 minut. Po tym czasie próbki zwirowano i ponownie umieszczono na lodzie. Do każdej probówki dodano 4 µl SuperScript™ IV VILO™ Master Mix i 6 µl wody wolnej od nukleaz. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf, Niemcy) zgodnie z programem przedstawionym w tabeli 3.6.

Tab. 3.6. Program reakcji odwrotnej transkrypcji

Etap	Temperatura	Czas
Przyłączenie starterów	25°C	10 min
Odwrotna transkrypcja RNA	50°C	10 min
Zahamowanie aktywności rewertazy	85°C	5 min

Do reakcji qPCR wykorzystano gotową mieszaninę reakcyjną (TaqMan™ Fast Advanced Master Mix) oraz sondy typu TaqMan™ (Thermo Fisher Scientific, USA) przedstawione w tabeli 3.7. Sondy te składają się z komplementarnego z badaną sekwencją oligonukleotydu, który na końcu 5' ma przyłączony fluorofor (donor) a na końcu 3' wygaszacz (akceptor). Zasada działania opiera się na mechanizmie transferu energii rezonansu Förstera (ang. *Förster resonance energy transfer*, FRET). Kiedy para donor-akceptor znajduje się blisko siebie, po wzbudzeniu donora energia zostaje przekazana do akceptora. Natomiast w przypadku kiedy cząsteczki znajdują się daleko od siebie, energia po wzbudzeniu jest widoczna jako promieniowanie fluorescencyjne. Podczas syntezy DNA dochodzi do wydłużania odległości między donorem i akceptorem, co powoduje emisję światła. Intensywność fluorescencji mierzona w każdym cyklu jest proporcjonalna do ilości produktu reakcji PCR.

Reakcje qPCR przeprowadzano w objętości 10 μ l, w studzienkach 96-dołkowej płytki MicroAmp® (Applied Biosystems, USA), w termocyklerze StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 3.8, a warunki reakcji w tabeli 3.9.

Tab. 3.7. Sondy TaqMan™ wyznakowane 6-karboksyfluoresceiną (FAM) wykorzystane w doświadczeniach

Nazwa genu	Nazwa sondy
<i>il-6</i>	Mm00446190_m1
<i>tnf-α</i>	Mm00443258_m1
<i>mmp-9</i>	Mm00442991_m1
<i>gapdh</i>	Mm99999915_g1

Tab. 3.8. Skład mieszaniny do przeprowadzenia jednej reakcji qPCR

Składnik	Objętość
TaqMan® Fast Advanced Master Mix 2x stężony	5 μ l
Sonda TaqMan® 20x stężona	0,5 μ l
woda wolna od nukleaz	3,5 μ l
cDNA	1 μ l

Po dodaniu wszystkich składowych mieszaniny reakcyjnej, płytkę zaklejono folią optyczną (MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, USA), a następnie krótko zwirowano, korzystając z wirówki Eppendorf.

Tab. 3.9. Program reakcji qPCR

Etap	Temperatura	Czas	Uwagi
aktywacja polimerazy	95°C	20 s	-
denaturacja	95°C	1 s	40 powtórzeń
przyłączanie/wydłużanie	60°C	20 s	

Poziomy ekspresji badanych genów analizowano z użyciem względnej analizy porównawczej $\Delta\Delta C_t$. Metoda ta wyraża logarytmiczną zmianę ekspresji genu między grupą kontrolną a grupą eksperymentalną, wykorzystując normalizację względem genu referencyjnego.

3.5 Analiza danych

3.5.1 Programy

Do zbierania i analizy danych wykorzystano programy przedstawione w tabeli 3.10.

Tab. 3.10. Wykorzystywane programy i skrypty

Nazwa	Producent/autor
Zbieranie i analiza danych behawioralnych	
EthoVision XT 14	Noldus Information Technology, Holandia
Eco-HAB.rfid, skrypt Delphi	Paweł Boguszewski, Ewelina Knapska, Alicja Puścian, Maciej Winiarski, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polska
pyEcoHAB, biblioteka Python	Joanna Jędrzejewska-Szmek, Jan Mąka, Szymon Łęski, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polska
Zbieranie i analiza danych molekularnych	
Image Lab 6.1	Bio-Rad, USA
Fiji: ImageJ2	Johannes Schindelin, Ignacio Arganda- Carreras, Albert Cardona i inni
StepOnePlus™ Systems	Applied Biosystems, USA
Analiza statystyczna	
Microsoft Excel	Microsoft for Windows, USA
GraphPad Prism 10	GraphPad Software, Inc, USA
JASP	JASP Team, University of Amsterdam, Holandia
Programy graficzne	
GIMP 2.10	Spencer Kimball, Peter Mattis, USA
Inkscape	Inkscape Project

3.5.2 Analizy statystyczne

Testowanie statystyczne przeprowadzono w programie GraphPad 10 oraz otwartym środowisku JASP. Wyniki analizowano za pomocą wieloczynnikowej analizy wariancji (ang. *two-; three-way ANOVA*) po uprzednim sprawdzeniu normalności rozkładów dla każdego zbioru danych przy użyciu testu Shapiro-Wilka oraz jednorodności wariancji przy użyciu testu Levene'a. Do każdej analizy wariancji przeprowadzono również analizę *post-hoc* stosując test Šídáka, porównywano wyłącznie grupy różniące się od siebie jednym z badanych czynników. Dane, które nie spełniały założeń normalności rozkładu lub jednorodności wariancji, zostały poddane testowi Kruskala-Wallisa w celu oceny efektu czynników oraz testom Manna-Whitneya z poprawką dla wielokrotnych porównań (Holma-Bonferroniego) w celu zbadania różnic pomiędzy grupami. Tak jak w przypadku analizy z wykorzystaniem testu parametrycznego, porównywano wyłącznie grupy różniące się jednym czynnikiem. Za istotne statystycznie uznawano wyniki testów dla których $p < 0,05$; z wyjątkiem kiedy stosowano poprawkę dla wielokrotnych porównań (próg istotności dostosowywano do liczby porównań).

4. WYNIKI

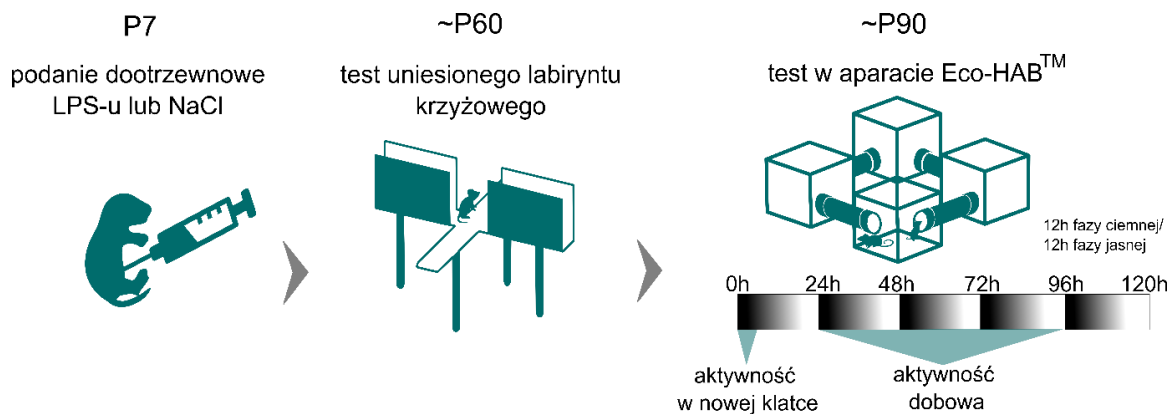
Uzyskane wyniki podzielone zostały na trzy podrozdziały. Pierwszy z nich (4.1.) stanowi charakterystykę behawioralną niezmienionych genetycznie myszy szczepu B6, poddanych aktywacji układu odpornościowego czynnikiem o pochodzeniu bakteryjnym – LPS – w siódmym dniu po narodzeniu. W drugim podrozdziale (4.2.) omówiono odpowiedź układu odpornościowego siedmiodniowych myszy B6 do 24 godzin po podaniu LPS. Natomiast w trzeciej części (podrozdział 4.3.) skupiono się na opisanu zmian w zachowaniu dorosłych zwierząt pozbawionych aktywnego białka MMP-9 (KO), po poddaniu stymulacji ich układu odpornościowego w siódmym dniu życia. We wszystkich podrozdziałach zastosowano te same oznaczenia kolorystyczne, tj. kolorem turkusowym oznaczono grupy traktowane LPS, a kolorem szarym grupy kontrolne zwierząt, którym podano NaCl. Dane na wykresach przedstawiono jako średnie $\pm$ odchylenie w postaci błędu standardowego średniej (ang. *standard error of the mean*, SEM).

4.1 Charakterystyka zachowania dorosłych myszy C57BL/6J (B6) po aktywacji układu odpornościowego w 7 dniu życia

Aby odpowiedzieć na pytanie, czy wykorzystywany model stymulacji układu odpornościowego wpływa na powstawanie długotrwałych zmian w zachowaniu, postanowiono ocenić: aktywność, emocjonalność oraz socjalność dorosłych zwierząt, po jednorazowym podaniu LPS w 7 dniu życia.

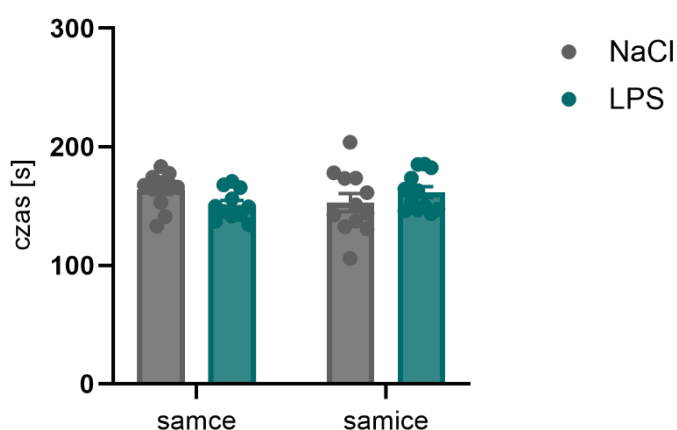
4.1.1 Aktywność zwierząt B6

Podstawowym analizowanym aspektem zachowania zwierząt była aktywność. W tym celu, wykonano testy EPM oraz Eco-HAB™ między drugim a trzecim miesiącem życia. Mierzono aktywność w nowym środowisku obu aparatów, a także aktywność dobową w systemie Eco-HAB™. Schemat doświadczeń przedstawiono na rycinie 4.1.



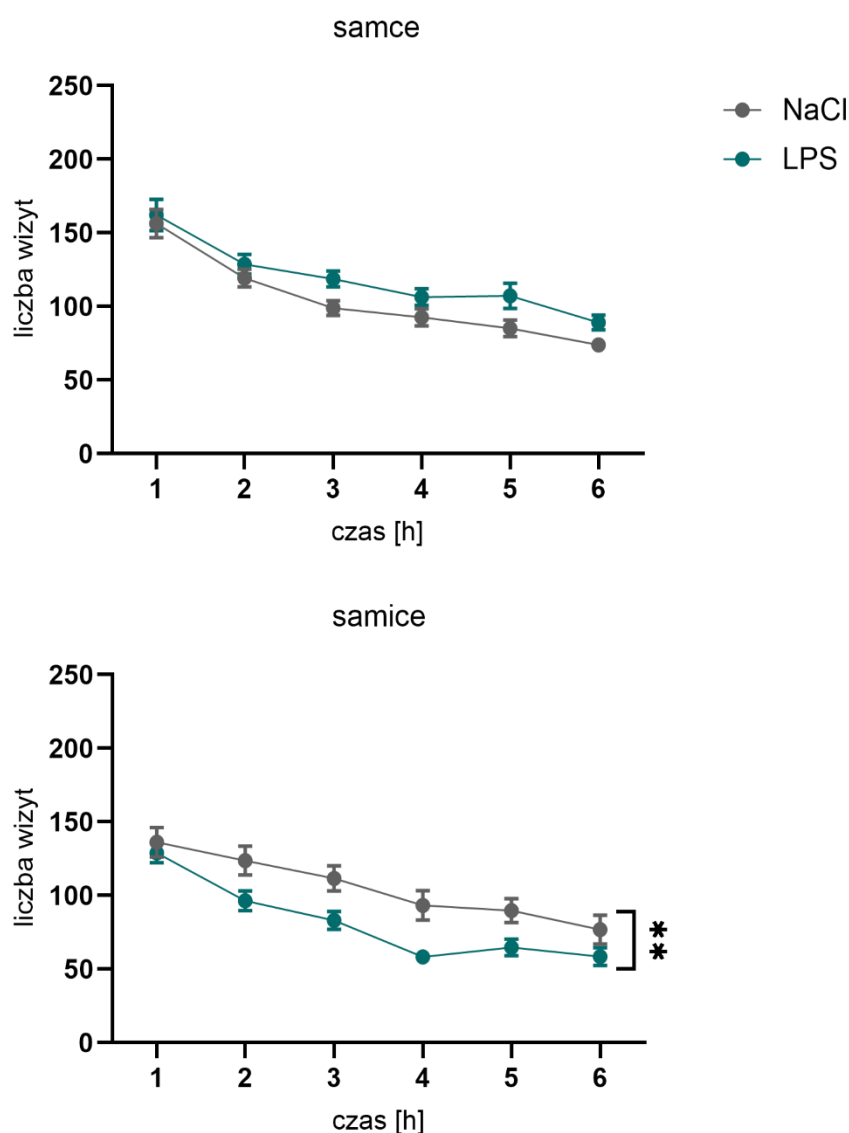
Ryc. 4.1. Testy behawioralne, podczas których mierzono aktywność w różnych warunkach. Nad schematami testów podano wiek zwierząt w czasie przeprowadzenia doświadczenia.

Zmierzono całkowity czas aktywności w nieznanym i potencjalnie niebezpiecznym środowisku aparatu EPM (ryc. 4.2). W ciągu 5 minut testu samce po otrzymaniu NaCl („samce NaCl” w dalszym tekście) eksplorowały aparat średnio $164,07 \pm 4,24$ s, samce po otrzymaniu LPS (dalej „samce LPS”) $150,98 \pm 3,79$ s, samice po iniekcji NaCl (samice NaCl $152,90 \pm 7,63$ s, a samice po podaniu LPS (samice LPS) $161,74 \pm 4,68$ s. Dwuczynnikowa analiza wariancji (podana substancja x płeć) wykazała istotny efekt tylko w przypadku interakcji obu czynników ($F_{1, 43} = 4,173$; $p < 0,05$), natomiast nie ujawniła istotności samego czynnika substancji ($F_{1, 43} = 0,157$; $p > 0,05$) ani płci ($F_{1, 43} = 0,001$; $p > 0,05$). Porównania *post-hoc* również nie wykazały różnic między grupami.



Ryc. 4.2. Aktywność myszy B6 w ciągu 5 minut testu EPM. Nie zaobserwowano różnic między grupami. Liczebność grup: ♂ NaCl n = 12, ♂ LPS n = 11, ♀ NaCl n = 12, ♀ LPS n = 12, gdzie n = liczba zwierząt użytych w badaniu.

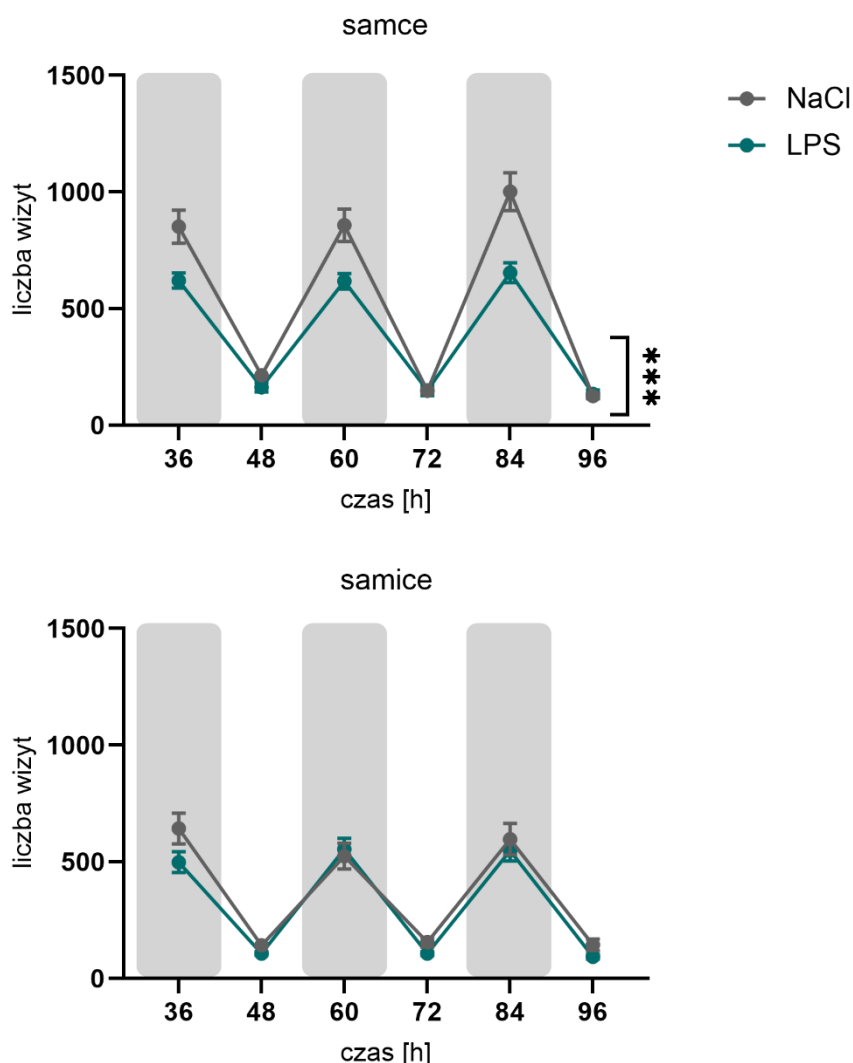
Ze względu na ograniczenia testu EPM, tj. konieczność testowania pojedynczej myszy, brak możliwości długotrwałej obserwacji zwierzęcia oraz udział eksperymentatora, postanowiono zbadać aktywność zwierząt również w zautomatyzowanej klatce Eco-HAB™. Eksplorację nowego środowiska w aparacie Eco-HAB™ oceniano za pomocą wskaźnika AUC, gdzie krzywa przedstawia aktywność zwierząt w ciągu pierwszych sześciu godzin od rozpoczęcia doświadczenia. Na wykresach (ryc. 4.3.) przedstawiono średnie wartości $\pm$ SEM dla poszczególnych punktów czasowych, natomiast analiza statystyczna została przeprowadzona na podstawie AUC.



Ryc. 4.3. Aktywność myszy B6 w nowym środowisku aparatu Eco-HAB™. Eksplorację aparatu wyrażono jako liczbę wizyt, zliczanych co godzinę, pomiędzy kłatkami. Samice traktowane LPS słabiej eksplorowały aparat Eco-HAB™ w porównaniu do samic traktowanych NaCl. Na wykresie ** oznacza $p \leq 0,01$. Liczebność grup: ♂ NaCl $n = 12$, ♂ LPS $n = 12$, ♀ NaCl $n = 12$, ♀ LPS $n = 12$, gdzie n = liczba zwierząt wykorzystanych w badaniu.

Średnia wartość AUC wynosiła dla grupy samce NaCl $510,92 \pm 23,58$; samce LPS $586,33 \pm 23,89$; samice NaCl $524,75 \pm 42,41$; samice LPS $396,00 \pm 26,15$. Dwuczynnikowa analiza wariancji (podana substancja x płeć) wykazała istotny efekt płci ($F_{1,44} = 8,630$; $p < 0,01$), ale nie podanej substancji ($F_{1,44} = 0,7880$; $p > 0,05$). Istotna okazała się również interakcja obu badanych czynników ($F_{1,44} = 11,55$; $p < 0,01$). Analiza *post-hoc* ujawniła słabszą eksplorację nowego środowiska przez samice traktowane LPS w porównaniu do grupy samic NaCl ($t = 3,031$, $p < 0,01$). Dodatkowo wykryto, iż w grupie zwierząt traktowanych LPS, to samce aktywniej poznawały aparat w porównaniu do samic (porównanie nie uwzględnione na wykresie, $t = 4,480$; $p < 0,0001$). Co ciekawe, taki efekt nie występował pomiędzy grupami kontrolnymi NaCl.

Kolejną analizowaną formą aktywności był tryb dobowy zwierząt. Aby zminimalizować wpływ habituacji do nowej klatki, analizę trybu dobowego wykonano na podstawie aktywności pomiędzy drugim a czwartym dniem eksperymentu w aparacie Eco-HAB™. Tak, jak w przypadku parametru eksploracja nowej klatki, na wykresach (Ryc. 4.4.) przedstawiono średnie wartości $\pm$ SEM dla poszczególnych punktów czasowych (pomiaru dokonywano w cyklu 12-godzinny), a analizę statystyczną została przeprowadzona na podstawie AUC. Średnie wartości AUC wynosiły: $2710,33 \pm 177,03$ dla grupy samce NaCl, $1962,33 \pm 100,26$ dla grupy samce LPS, $1813,92 \pm 164,28$ dla grupy samice NaCl oraz $1612,58 \pm 117,28$ dla grupy samice LPS. Analiza aktywność dobowej myszy B6 wykazała istotny wpływ zarówno czynnika płci ($F_{1,44} = 18,91$; $p < 0,0001$) oraz podanej substancji ($F_{1,44} = 10,97$; $p < 0,01$), nie wykazano jednak istotnego wpływu pomiędzy czynnikami ($F_{1,44} = 3,639$; $p > 0,05$). Samce LPS były mniej aktywne od samców traktowanych NaCl, co wykazała analiza *post-hoc* ($t = 3,691$; $p < 0,001$). Porównanie samców i samic z grup kontrolnych NaCl, wykryło wyższą aktywność dobową samców ($t = 4,423$; $p < 0,0001$).

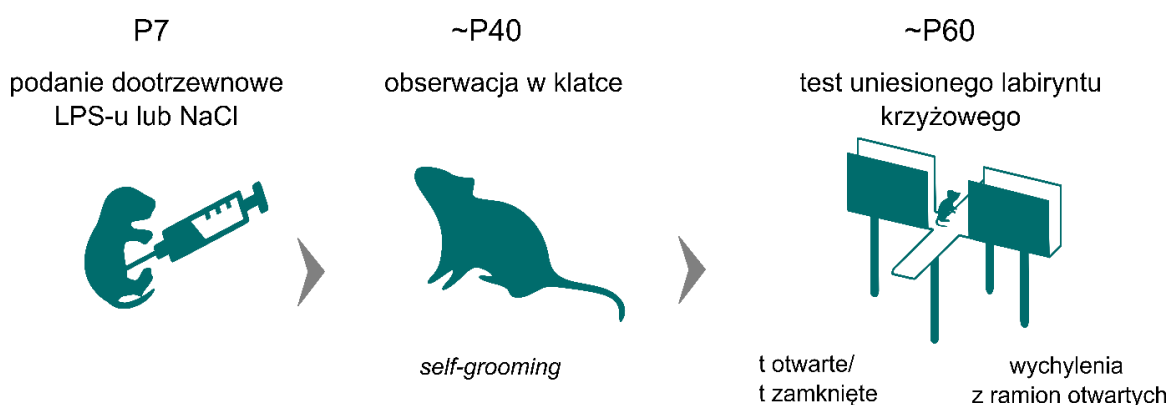


Ryc. 4.4. Aktywność dobową myszy B6. Liczbę wizyt pomiędzy klatkami aparatu Eco-HAB™ mierzono między 2 a 4 dniem eksperymentu (w cyklu dwunastogodzinnym, szarymi prostokątami oznaczono fazę ciemną). Samce z grupy LPS były mniej aktywne od samców z grupy NaCl. Na wykresie *** oznacza $p \leq 0,001$. Liczebność grup: ♂ NaCl $n = 12$, ♂ LPS $n = 12$, ♀ NaCl $n = 12$, ♀ LPS $n = 12$, gdzie n = liczba zwierząt wykorzystanych w badaniu.

Podsumowując, podanie LPS obniżyło aktywność zwierząt B6 w porównaniu do grupy kontrolnej NaCl, przy czym efekt ten był zależny od płci. Samice po wczesniej aktywacji układu odpornościowego wykazywały mniejszą aktywność podczas eksploracji nowej klatki, natomiast u samców różnica w aktywności była widoczna jedynie po habituacji do klatki. Warto również zwrócić uwagę na fakt, że różnice między grupami były uwidocznione wyłącznie podczas testu przeprowadzanego w grupie (w aparacie Eco-HAB™), a nie kiedy zwierzęta testowano pojedynczo.

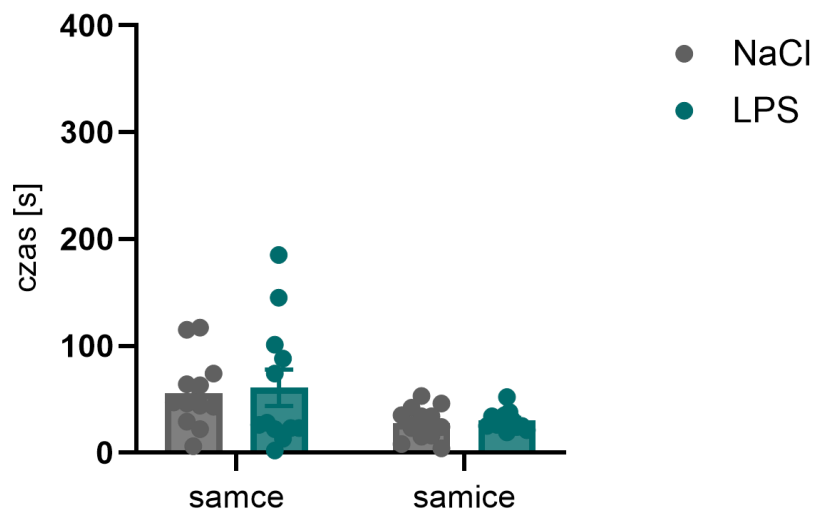
4.1.2 Emocjonalność zwierząt B6

Badania obejmujące zwierzęce modele aktywacji układu odpornościowego ciężarnej matki (MIA) wczesnej aktywacji układu odpornościowego, bądź inne modele stresu na wczesnym etapie życia wskazywały na występowanie zmiany w emocjonalności zwierząt w tych modelach^{111,178,180–182}. W niniejszej rozprawie również postanowiono zmierzyć ten aspekt zachowania. Jako miarę emocjonalności przyjęto reakcję na stresujące warunki, w tym występowanie repetytywnych wzorców zachowań oraz chęć podejmowania ryzykownych działań. Zastosowane testy przedstawiono na rycinie 4.5.



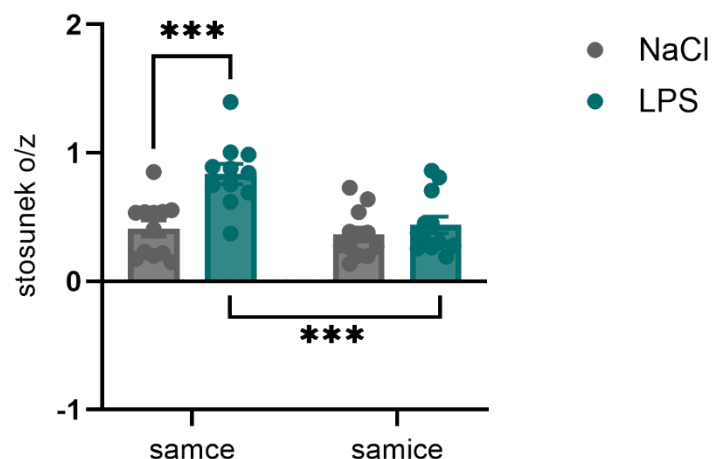
Ryc. 4.5. Testy behawioralne mierzące emocjonalność zwierząt. Nad schematami testów podano wiek zwierząt podczas przeprowadzania doświadczenia, a pod nimi mierzone parametry.

W pierwszej kolejności postanowiono poddać ocenie zachowanie myszy w klatce domowej. Podczas obserwacji pojedynczego zwierzęcia zwracano uwagę na epizody czyszczenia futerka i zliczano łączny czas, jaki mysz poświęciła na tę czynność (rycina 4.6.) Podczas testu sprawdzano również czy występują stereotypie, np. kręcenie się w kółko lub kopanie w jednym miejscu (mimo ograniczenia ściółki). Nie zauważono jednak tego typu zachowania w żadnej z grup. Średni czas (s) spędzony na self-groomingu dla grupy samce NaCl wynosił $55,83 \pm 9,74$; dla grupy samce LPS $60,83 \pm 16,84$; w przypadku samic NaCl $27,83 \pm 4,43$; a samic LPS $30,25 \pm 2,61$. Ocena statystyczna (Kruskal-Wallis, podana substancja oraz płeć) wykazała istotność czynnika płci ($H1 = 4,341$; $p < 0,05$), natomiast czynnik substancji nie okazał się istotny ($H1 = 0,288$; $p > 0,05$). Testowanie między grupami nie wykazało jednak różnic między grupami.



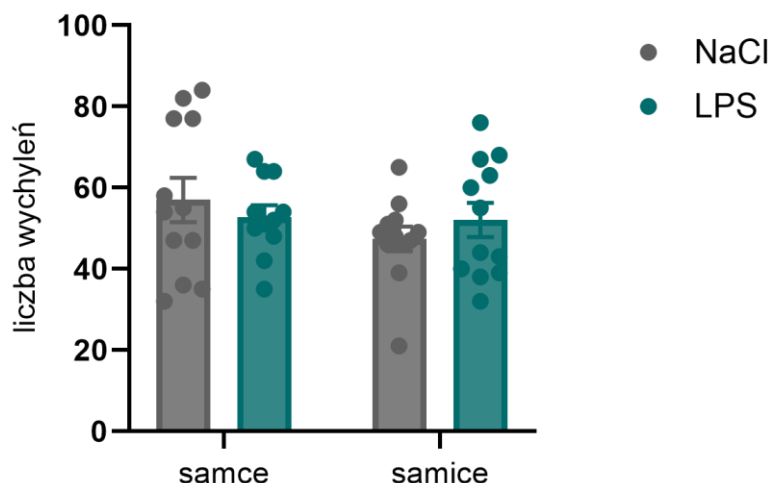
Ryc. 4.6. Self-grooming myszy B6. Czas spędzony na pielęgnacji futra w trakcie 10-minutowej obserwacji odosobnionego zwierzęcia w klatce domowej. Nie wykazano różnic między grupami. Liczebność grup: ♂ NaCl n = 12, ♂ LPS n = 12, ♀ NaCl n = 12, ♀ LPS n = 12, gdzie n = liczba zwierząt użytych w badaniu.

W celu oceny reakcji na stres wykorzystano test EPM. Jak wspomniano w rozdziale 3, na zachowanie zwierzęcia w tym teście wpływają dwa antagonizujące czynniki, awersja do niebezpiecznego otoczenia i potrzeba eksploracji. Do oceny lęklivosti zastosowano stosunek czasu spędzonego w „niebezpiecznych” strefach labiryntu do czasu spędzonego w „bezpiecznych”, zamkniętych ramionach. Wyższa wartość wskaźnika, wskazywała wyższą odporność na stres, czyli sugerowała przewagę potrzeby eksploracji nad lękiem. Wyniki przedstawiono na rycinie 4.7. Wartości stosunku o/z przedstawiały się następująco: samce NaCl $0,41 \pm 0,063$; samce LPS $0,83 \pm 0,078$; samice NaCl $0,36 \pm 0,05$; samice LPS $0,44 \pm 0,07$. Ocena statystyczna z użyciem testu 2-way ANOVA, wykazała istotny efekt obu zmiennych (podana substancja: $F_{1,43} = 14,67$; $p < 0,001$; płeć: $F_{1,43} = 11,55$; $p < 0,01$), a także ich współdziałania ($F_{1,43} = 7,276$; $p < 0,01$). Analiza *post-hoc* wykazała wyższy wskaźnik o/z w grupie samców traktowanych LPS w porównaniu z grupą kontrolną samców NaCl ($t = 4,565$; $p < 0,001$). Stwierdzono również istotną różnicę między grupami traktowanymi LPS – wskaźnik o/z u samców LPS był znacznie wyższy niż u samic LPS ($t = 4,264$; $p < 0,001$).



Ryc. 4.7. Lękliwość myszy B6. Stosunek czasu spędzonego w ramionach otwartych labiryntu do czasu spędzonego w ramionach zamkniętych aparatu EPM (stosunek o/z). Samce LPS spędziły więcej czasu w ramionach otwartych w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo, wskaźnik o/z był wyższy u samców LPS w porównaniu do samic LPS. Na wykresie *** oznacza $p \leq 0,001$. Liczebność grup: ♂ NaCl $n = 12$, ♂ LPS $n = 11$, ♀ NaCl $n = 12$, ♀ LPS $n = 12$, gdzie n = liczba zwierząt użytych w badaniu.

Kolejnym mierzony aspektem emocjonalności zwierząt była chęć podejmowania ryzyka. Aby zmierzyć to zachowanie, wykorzystano liczbę niezabezpieczonych wychyleń z ramion otwartych labiryntu. Wyniki zaprezentowano na rycinie 4.8. Średnia liczba wychyleń wyniosła $57,00 \pm 5,45$ dla samców grupy NaCl, $52,82 \pm 2,90$ dla samców grupy LPS; $47,42 \pm 3,01$ dla samic grupy NaCl oraz $52,09 \pm 4,18$ dla samic grupy LPS. Analiza statystyczna nie wykazała wpływu podanej substancji ($F_{1, 43} = 0,000$; $p > 0,05$), płci ($F_{1, 43} = 1,610$; $p > 0,05$), ani interakcji obu zmiennych ($F_{1, 43} = 1,184$; $p > 0,05$) na liczbę niezabezpieczonych wychyleń podczas testu EPM.

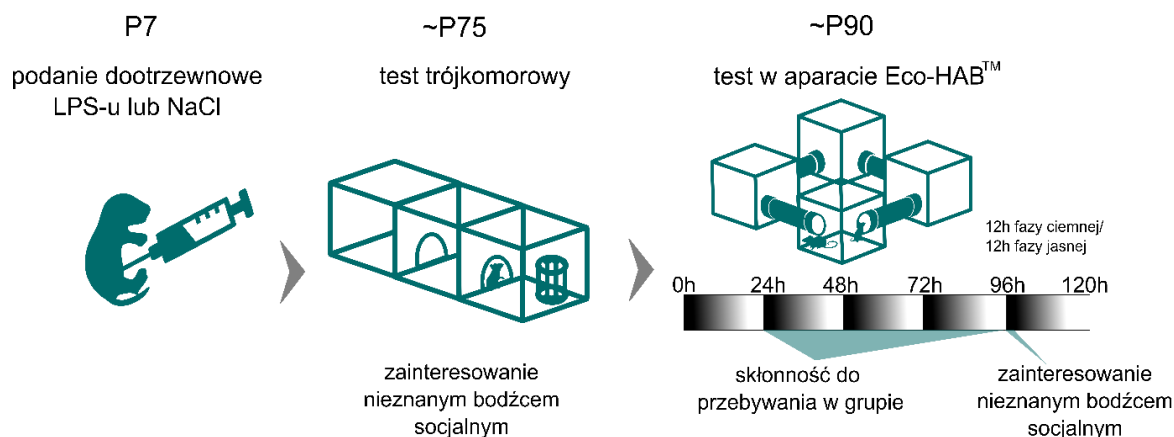


Ryc. 4.8. Predyspozycja zwierząt linii B6 do podejmowania zachowania ryzykownego. Niezabezpieczone wychylenia z ramion otwartych EPM wskazują na podejmowanie ryzykownych zachowań. Nie stwierdzono różnic między grupami. Liczebność grup: ♂ NaCl n = 12, ♂ LPS n = 11, ♀ NaCl n = 12, ♀ LPS n = 12, gdzie n = liczba zwierząt wykorzystanych w badaniu.

W badanym modelu wczesnej aktywacji układu odpornościowego zaobserwowano, że wpływała ona na lękliwość samców, natomiast nie miała wpływu na samice. Samce poddane iniekcji LPS wykazywały niższą lękliwość podczas testu EPM, jednak nie podejmowały zwiększonego ryzyka.

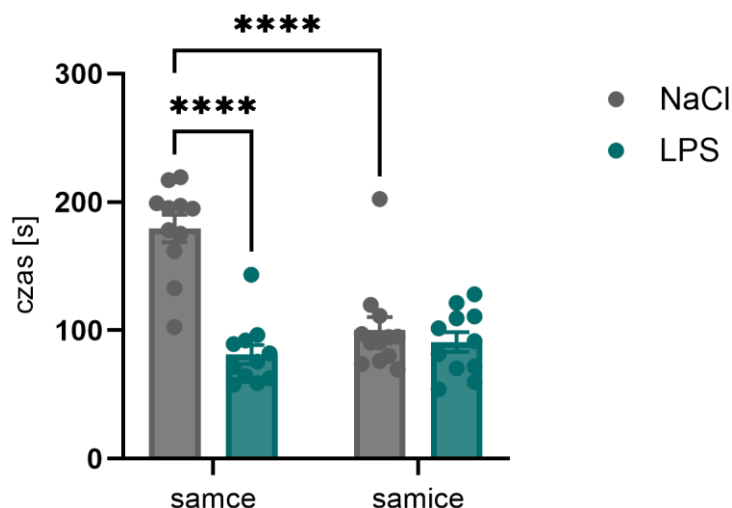
4.1.3 Socjalność zwierząt B6

Do charakterystyki wielu zaburzeń neurorozwojowych należą zmiany w interakcjach społecznych. Mogą one być związane z zaburzeniami w komunikacji, niedostosowaniem zachowania do sytuacji czy nierozumieniem norm społecznych. Zmiany w tej sferze stają się często kryterium diagnostycznym zaburzeń takich jak zaburzenia ze spektrum autyzmu czy schizofrenia¹. Sprawdzenie więc, czy w badanym modelu dochodzi do zmiany w socjalności zwierząt wydało się naturalnym, kolejnym krokiem. Postanowiono zbadać zainteresowanie nieznany bodźcem społecznym, a myszy testowano zarówno pojedynczo (test trójkomorowy) jak i w grupie (Eco-HAB™). Przeanalizowano również skłonność do przebywania w znanej grupie zwierząt. Badanie przeprowadzono na zwierzętach w wieku od 2,5 do 3 miesięcy, ze względu na to, że zachowania społeczne i ich dynamika formują się w okresie adolescencji^{183,184}. Schematycznie przedstawiono przebieg doświadczenia na rycinie 4.9.



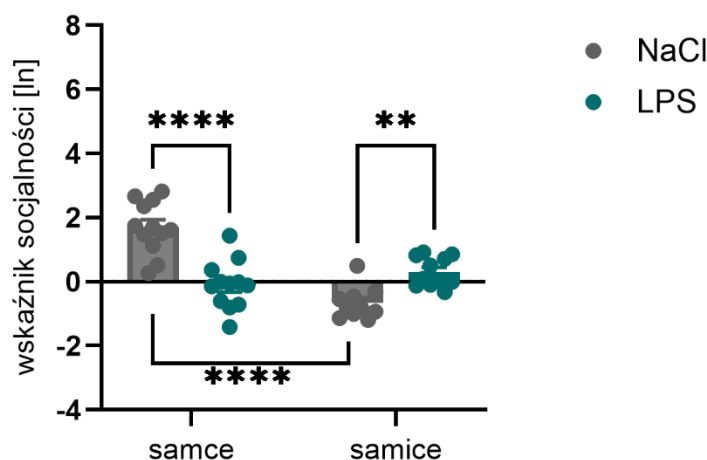
Ryc. 4.9. Testy behawioralne mierzące zachowania społeczne w różnych warunkach. Nad schematami testów podano wiek zwierząt podczas przeprowadzania doświadczenia.

Pierwszą zastosowaną metodą, w celu oceny socjalności zwierząt, był test trójkomorowy. Zmierzono czas jaki zwierzę spędziło na kontakcie z bodźcem socjalnym, którym była ściółka pochodząca z klatki 2-3 nieznanych myszy. Średni czas jaki zwierzęta spędzały na kontakcie z nieznany bodźcem socjalnym (w sekundach) wynosiły: $179,4 \pm 10,71$ dla samców NaCl, $81,25 \pm 7,44$ dla samców LPS, $100,1 \pm 10,24$ dla samic NaCl oraz $90,9 \pm 7,59$ dla samic LPS. Dane te przedstawiono na rycinie 4.10. Testowanie statystyczne (podana substancja x płeć) wykazało istotny wpływ podanej substancji ($F_{1, 38} = 26,16$; $p < 0,0001$), czynnika płci ($F_{1, 38} = 16,23$; $p < 0,001$), a także wzajemne oddziaływanie obu czynników ($F_{1, 38} = 31,16$; $p < 0,0001$). Dalsza analiza ujawniła, że samce po podaniu LPS spędziły krótszy czas na kontakcie z nieznany zapachem socjalnym, w porównaniu do samców z grupy kontrolnej ($t = 7,563$; $p < 0,0001$). Oprócz tego, wykazano niższe zainteresowanie bodźcem przez samice NaCl w porównaniu do samców NaCl ($t = 6,963$; $p < 0,0001$).



Ryc. 4.10. Zainteresowanie zwierząt B6 bodźcem socjalnym pochodzącym od nieznanych zwierząt podczas 10 minut testu trójkomorowego. Różnice zauważono wśród samców, grupa LPS spędziła mniej czasu na kontakcie z bodźcem socjalnym w porównaniu do samców NaCl. Dodatkowo samice NaCl były mniej zainteresowane nieznany zapachem socjalnym w porównaniu do samców NaCl. Na wykresie **** oznacza $p \leq 0,0001$. Liczebność grup: ♂ NaCl $n = 11$, ♂ LPS $n = 11$, ♀ NaCl $n = 12$, ♀ LPS $n = 11$, gdzie n = liczba zwierząt wykorzystanych w badaniu.

Następnie postanowiono sprawdzić, czy taki sam efekt będzie obserwowany podczas prezentacji nieznanego bodźca w znanym środowisku w grupie. Na początku fazy ciemnej, piątego dnia testu w aparacie Eco-HAB™, za perforowanymi przegrodami umieszczono bodziec socjalny, którym ponownie była ściółka pochodząca od nieznanych badanych myszom osobników, oraz czysta ściółka jako kontrola. Wykorzystywany do oceny wskaźnik socjalności oraz metoda jego obliczania zostały dokładniej opisane w rozdziale 3 - Materiały i metody. Warto natomiast wspomnieć, że wartości dodatnie stanowiły o zainteresowaniu bodźcem, natomiast ujemne o awersji względem niego. Dane uzyskane podczas pierwszej godziny po prezentacji bodźców pokazano na rycinie 4.11.

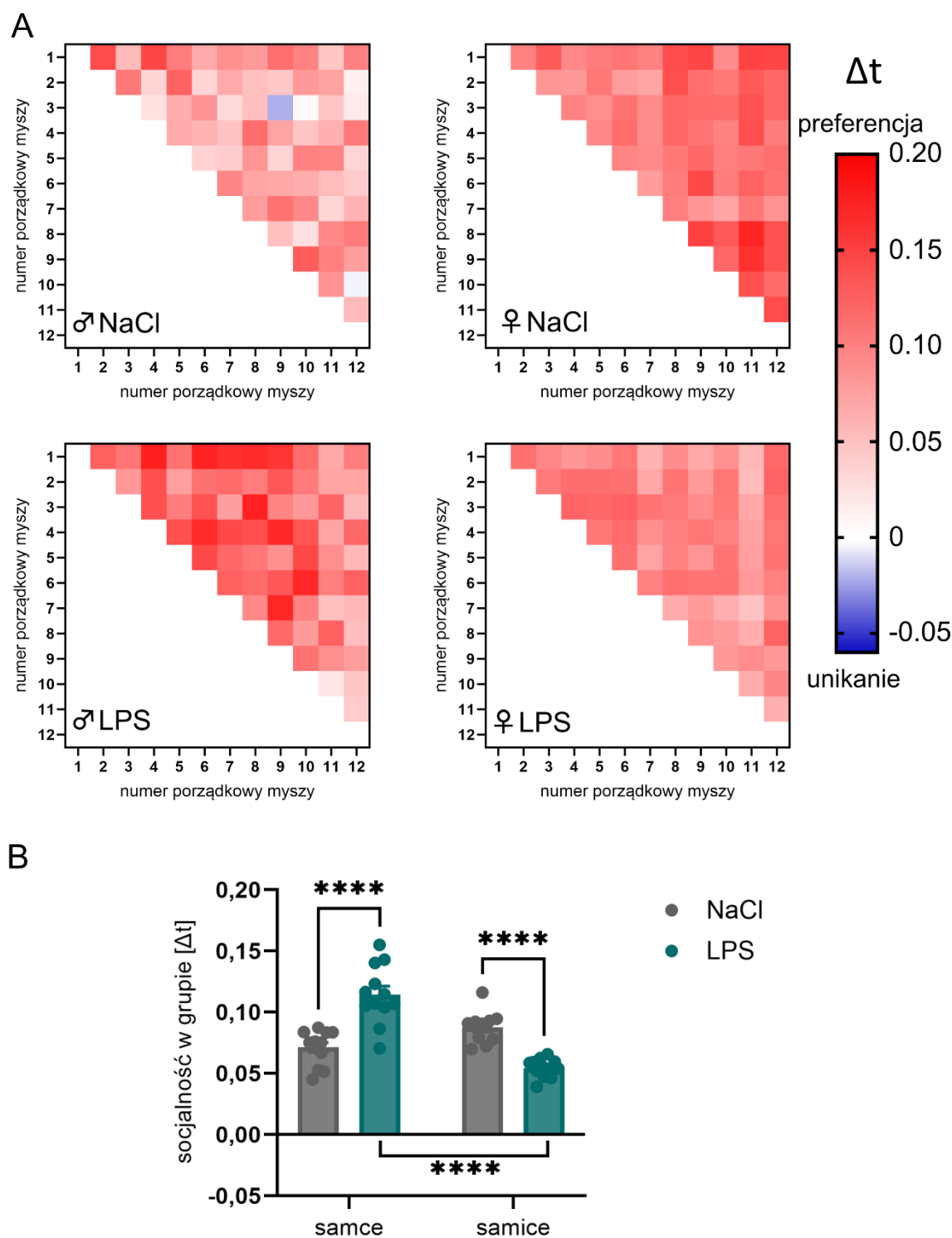


Ryc. 4.11. Zainteresowanie zwierząt B6 bodźcem socjalnym pochodzącym od nieznanych zwierząt podczas pierwszej godziny od prezentacji bodźców podczas testu Eco-HAB™. Samce traktowane LPS były mniej zainteresowane nieznanim bodźcem socjalnym, natomiast samice z grupy LPS wykazywały wyższe zainteresowanie bodźcem socjalnym w porównaniu do kontroli NaCl. Na wykresie ** oznacza $p \leq 0,01$, a **** $p \leq 0,0001$. Liczebność grup: ♂ NaCl $n = 12$, ♂ LPS $n = 12$, ♀ NaCl $n = 10$, ♀ LPS $n = 11$, gdzie n = liczba zwierząt wykorzystanych w badaniu.

Wskaźnik socjalności wynosił średnio $1,70 \pm 0,23$ w grupie samców NaCl; $-0,11 \pm 0,22$ w grupie samców LPS; $-0,67 \pm 0,16$ w grupie samic NaCl oraz $0,31 \pm 0,14$ w grupie samic LPS. Porównując wskaźniki socjalności między grupami (podana substancja x płeć) wykazano istotny wpływ płci ($F_{1,41} = 24,42$; $p < 0,0001$) i podanej substancji ($F_{1,41} = 4,460$, $p < 0,05$) na uzyskany efekt. Efekt współdziałania obu zmiennych również okazał się istotny ($F_{1,41} = 49,82$; $p < 0,0001$). Porównania między grupami ujawniły brak zainteresowania nieznanim bodźcem społecznym samców LPS w porównaniu do samców NaCl ($t = 6,716$; $p < 0,0001$). Co ciekawe, odwrotny efekt zaobserwowano u samic. Samice traktowane LPS wykazywały wyższą ciekawość względem obcego zapachu socjalnego w porównaniu do samic NaCl ($t = 3,385$; $p < 0,01$). Oprócz tego, tak jak w przypadku testu trójkomorowego, zauważono mniejsze zainteresowanie wśród samic NaCl w porównaniu do samców NaCl ($t = 8,379$; $p < 0,0001$).

Ostatnim badanym parametrem była socjalność zwierząt w znanej grupie. Jak wspomniano wcześniej myszy są zwierzętami stadnymi, a zautomatyzowane klatki dają możliwość śledzenia zachowania pojedynczej myszy żyjącej w grupie. Pomiary socjalności w grupie dokonywano między drugim a czwartym dniem testu w aparacie Eco-HAB™. W rozdziale 3. Materiały i metody dokładnie opisano sposób obliczania

wskaźnika socjalność w grupie. Panel A ryciny 4.12. przedstawia mapy ciepła, na których zaprezentowano wyniki otrzymane dla każdej pary myszy. Wizualne przedstawienie danych ujawniło, iż samce traktowane LPS chętniej spędzały ze sobą czas w porównaniu do samców NaCl (wyższe wartości parametru Δt w grupie ♂ LPS). Natomiast samice traktowane LPS spędziły mniej czasu razem w porównaniu do samic NaCl. Analiza statystyczna została przeprowadzona na średnich wartościach Δt dla każdej z myszy. Średnie wartości parametru Δt dla grup przedstawiały się następująco: samce NaCl $0,071 \pm 0,004$; samce LPS $0,114 \pm 0,007$; samice NaCl $0,088 \pm 0,004$; samice LPS $0,054 \pm 0,002$ i zostały przedstawione na panelu B ryciny 4.12. Czynniki płci oraz interakcja między czynnikami (podana substancja x płeć) okazały się mieć istotny wpływ na otrzymany efekt (płeć: $F_{1, 44} = 23,48$; $p < 0,0001$; interakcja: $F_{1, 44} = 71,72$; $p < 0,0001$), natomiast sama zmienna „podana substancja” nie okazała się istotna ($F_{1, 44} = 1,227$; $p > 0,05$). Porównania *post-hoc* między grupami potwierdziły wnioski wyciągnięte na podstawie map cieplnych. Samce LPS spędzały chętniej czas w grupie w porównaniu do samców NaCl ($t = 6,772$; $p < 0,0001$), natomiast samice LPS spędzały mniej czasu razem w porównaniu do grupy samic NaCl ($t = 5,205$; $p < 0,0001$). Zauważono również różnicę między grupami traktowanymi LPS, samice były mniej zainteresowane spędzaniem czasu w grupie od samców ($t = 9,415$; $p < 0,0001$).

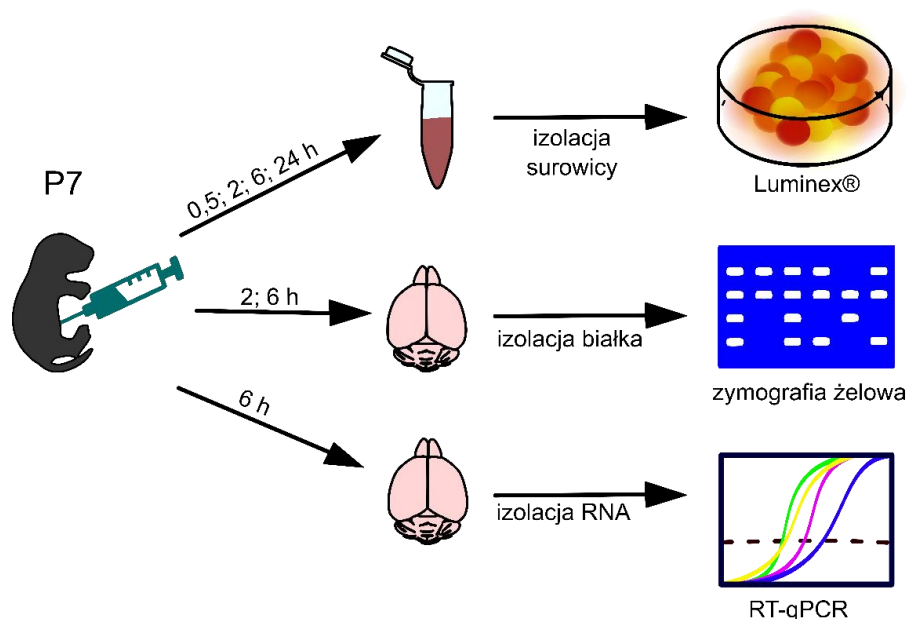


Ryc. 4.12. Skłonność myszy B6 do przebywania w grupie mierzona pomiędzy drugim a czwartym dniem testu Eco-HAB™. A. Mapy ciepłne. Każdy kwadrat w macierzy reprezentuje parę zwierząt i pokazuje różnicę między całkowitym czasem spędzonym razem, a czasem jaki zwierzęta spędziłyby wspólnie, gdyby niezależnie eksplorowały aparat (na osiach umieszczono numery porządkowe zwierząt). Intensywność koloru czerwonego jest proporcjonalna do wartości Δt . **B.** Średnie wartości socjalności w grupie dla każdej z myszy. Samce LPS spędzały średnio więcej czasu razem, natomiast samice LPS spędzały mniej czasu razem w porównaniu do grup kontrolnych. Na wykresie **** oznacza $p \leq 0,0001$. Liczebność grup: ♂ NaCl $n = 12$, ♂ LPS $n = 12$, ♀ NaCl $n = 12$, ♀ LPS $n = 12$, gdzie n = liczba zwierząt użytych w badaniu.

Socjalność zwierząt poddanych aktywacji układu odpornościowego w siódmym dniu, wydaje się być najbardziej skomplikowanym aspektem zachowania. Samce i samice reagowały inaczej na podany LPS. U samców podanie LPS powodowało spadek zainteresowania nieznany bodźcem społecznym, natomiast wzmacniało chęć przebywania w znanej grupie. Samice traktowane LPS były bardziej zainteresowane nieznany bodźcem socjalnym, ale efekt ten zaobserwowano dopiero podczas dłuższej ekspozycji na zapach, wtedy kiedy zwierzęta przebywały w grupie (efekt, był widoczny tylko w aparacie Eco-HAB™). W odróżnieniu od samców, samice LPS mniej chętnie spędzały czas w stadzie w porównaniu do grupy samic NaCl.

4.2 Odpowiedź układu odpornościowego siedmiodniowych myszy B6 na LPS

Wyniki przedstawione w podrozdziale 4.1. potwierdziły istotny wpływ jednorazowego podania LPS w P7 na zachowanie dorosłych myszy B6. Zauważono jednak inne oddziaływanie na samce oraz samice. Wcześniejsze prace również sugerowały, że płeć może być czynnikiem różnicującym efekt wczesnej aktywacji układu odpornościowego^{124,185–187}. Z tego powodu postanowiono bliżej przyjrzeć się odpowiedzi układu odpornościowego siedmiodniowych myszy na czynnik zapalny. W badanym modelu skupiono się zarówno na reakcji odpornościowej we krwi jak i w OUN. Schemat doświadczenia, punkty czasowe, w których pobierano wybrane tkanki oraz zastosowane metody zaprezentowano na rycinie 4.13.



Ryc. 4.13. Schemat doświadczeń z wykorzystaniem metod biologii molekularnej. Nad strzałkami podano czas pobrania tkanek jaki upłynął od iniekcji LPS lub NaCl.

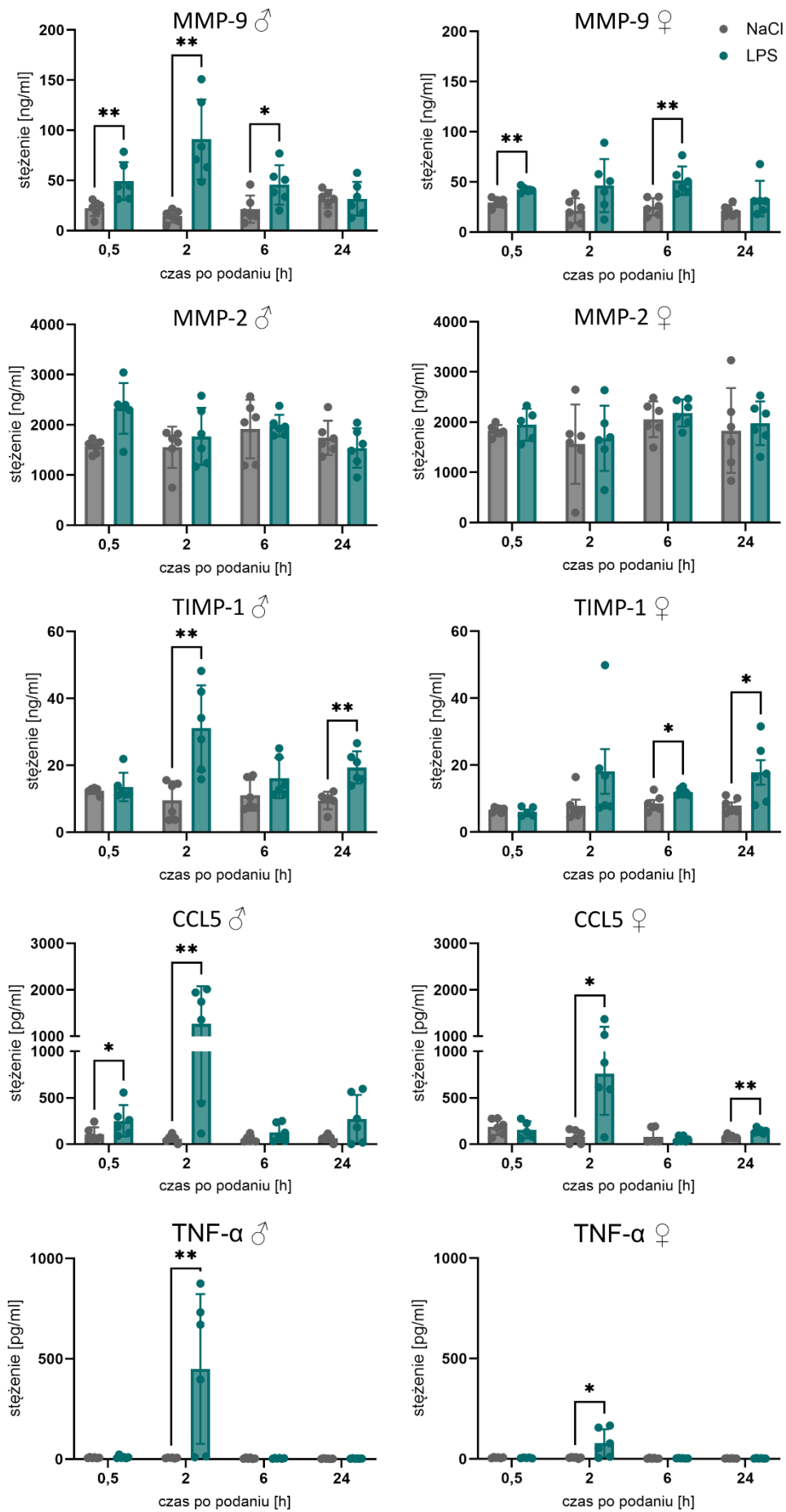
4.2.1 Stężenia białek w surowicy osesków

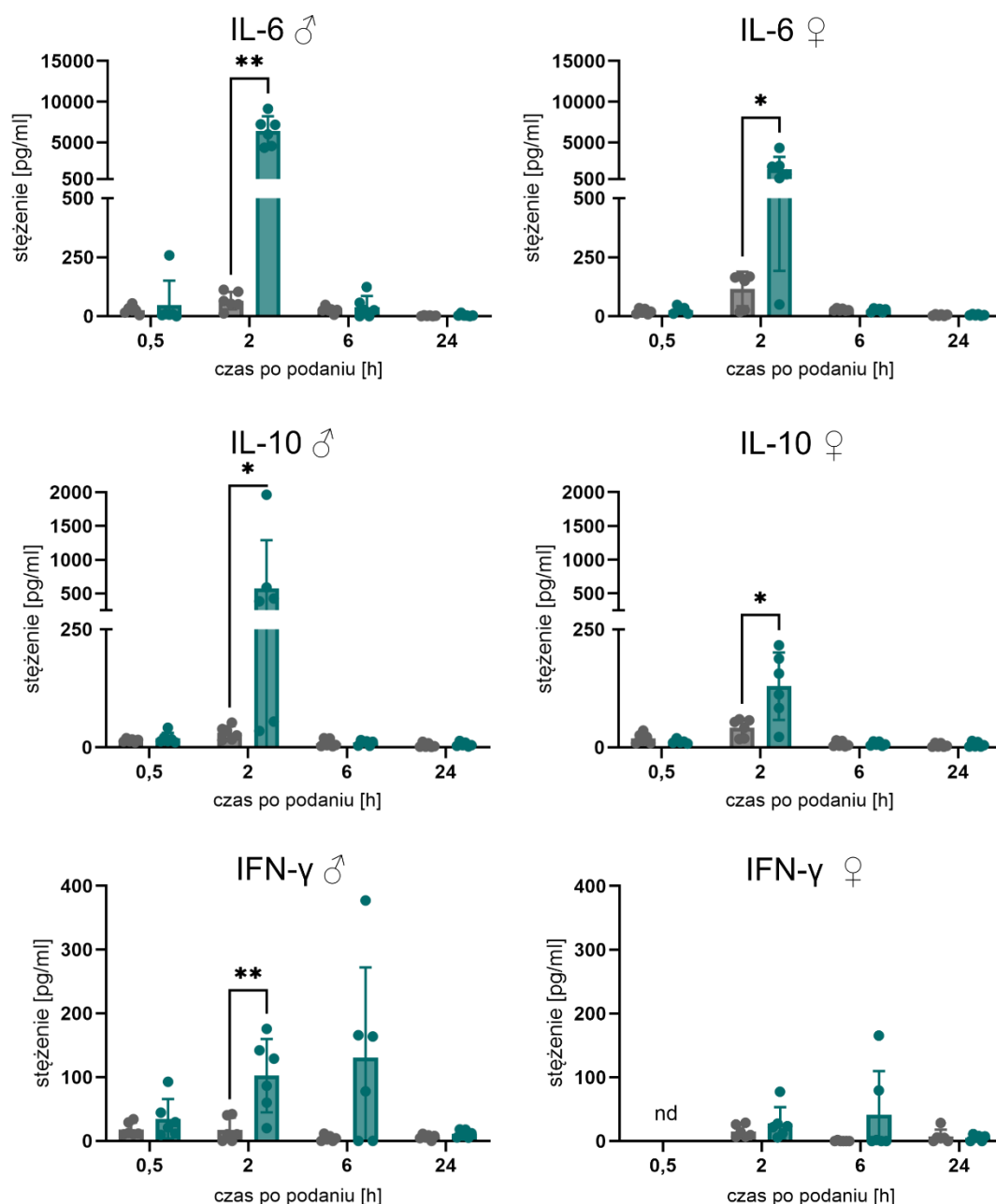
Pierwszym krokiem była ocena stanu zapalnego we krwi. Zmierzono poziom cytokin oraz białek w surowicy, w czterech punktach czasowych: 0,5; 2; 6 oraz 24 godziny. Z 15 wybranych analitów w próbkach udało się wykryć MMP-9, MMP-2, TIMP-1, CCL5, TNF- α , IL-6, IL-10 oraz IFN- γ . Uzyskane stężenia tych białek przedstawiono na rycinie 4.14., a średnie wartości w tabeli 4.1.

Tab. 4.1. Stężenia białek w grupach doświadczalnych wykryte w surowicy myszy B6, w czterech punktach czasowych po iniekcji. Dane przedstawiono jako średnia $\pm$ SEM.

Białko	Grupa	Czas [godz.]			
		0,5	2	6	24
MMP-9 ng/ml	♂ NaCl	22,23 $\pm$ 3,20	14,30 $\pm$ 2,53	21,38 $\pm$ 5,59	31,45 $\pm$ 3,70
	♂ LPS	49,19 $\pm$ 7,68	90,86 $\pm$ 16,3	45,52 $\pm$ 8,01	31,75 $\pm$ 6,87
	♀ NaCl	29,42 $\pm$ 1,83	21,32 $\pm$ 5,05	25,21 $\pm$ 3,51	21,33 $\pm$ 2,30
	♀ LPS	42,33 $\pm$ 1,39	46,25 $\pm$ 10,83	51,20 $\pm$ 5,82	33,44 $\pm$ 7,23
MMP-2 ng/ml	♂ NaCl	1567,05 $\pm$ 55,59	1553,93 $\pm$ 167,95	1917,98 $\pm$ 238,64	1742,35 $\pm$ 140,19
	♂ LPS	2327,05 $\pm$ 206,42	1768,92 $\pm$ 232,23	1982,11 $\pm$ 89,02	1539,12 $\pm$ 161,40
	♀ NaCl	1831,11 $\pm$ 46,20	1562,76 $\pm$ 322,70	2057,86 $\pm$ 145,38	1832,45 $\pm$ 344,69
	♀ LPS	1947,34 $\pm$ 143,38	1679,24 $\pm$ 265,70	2183,30 $\pm$ 109,02	1977,87 $\pm$ 178,38
TIMP-1 ng/ml	♂ NaCl	12,46 $\pm$ 0,40	9,57 $\pm$ 2,31	10,18 $\pm$ 1,55	9,49 $\pm$ 1,06
	♂ LPS	13,52 $\pm$ 1,74	31,13 $\pm$ 5,22	17,07 $\pm$ 2,26	19,37 $\pm$ 1,96
	♀ NaCl	6,62 $\pm$ 0,29	7,87 $\pm$ 1,79	8,59 $\pm$ 1,01	7,97 $\pm$ 0,92
	♀ LPS	6,09 $\pm$ 0,61	18,11 $\pm$ 6,69	11,98 $\pm$ 0,44	17,80 $\pm$ 3,67
CCL5 pg/ml	♂ NaCl	106,33 $\pm$ 30,69	58,00 $\pm$ 16,14	52,60 $\pm$ 14,77	63,54 $\pm$ 15,09
	♂ LPS	251,40 $\pm$ 68,85	1268,33 $\pm$ 329,74	126,77 $\pm$ 39,33	271,72 $\pm$ 105,8
	♀ NaCl	185,52 $\pm$ 35,58	81,11 $\pm$ 29,57	82,85 $\pm$ 33,53	78,76 $\pm$ 8,19
	♀ LPS	154,32 $\pm$ 41,55	759,30 $\pm$ 180,79	54,04 $\pm$ 12,64	140,72 $\pm$ 10,60
TNF- α pg/ml	♂ NaCl	6,99 $\pm$ 0,84	18,11 $\pm$ 6,69	11,98 $\pm$ 0,44	17,81 $\pm$ 3,67
	♂ LPS	9,51 $\pm$ 2,733	449,51 $\pm$ 152,34	3,75 $\pm$ 0,69	2,82 $\pm$ 0,49
	♀ NaCl	6,41 $\pm$ 0,98	6,52 $\pm$ 1,32	3,02 $\pm$ 0,85	2,45 $\pm$ 0,38
	♀ LPS	5,09 $\pm$ 0,82	78,61 $\pm$ 28,46	3,32 $\pm$ 0,34	2,62 $\pm$ 0,52
IL-6 pg/ml	♂ NaCl	26,46 $\pm$ 6,89	66,10 $\pm$ 15,19	26,58 $\pm$ 5,41	1,62 $\pm$ 0,60
	♂ LPS	47,79 $\pm$ 42,05	6409,53 $\pm$ 739,97	38,91 $\pm$ 19,08	4,50 $\pm$ 2,17
	♀ NaCl	19,89 $\pm$ 4,39	115,81 $\pm$ 29,80	27,75 $\pm$ 1,89	4,72 $\pm$ 1,30
	♀ LPS	26,24 $\pm$ 7,03	1706,73 $\pm$ 618,4	25,68 $\pm$ 2,94	5,54 $\pm$ 1,14
IL-10 pg/ml	♂ NaCl	14,76 $\pm$ 1,34	30,86 $\pm$ 5,81	9,00 $\pm$ 3,32	4,57 $\pm$ 1,91
	♂ LPS	19,50 $\pm$ 4,65	575,87 $\pm$ 291,74	9,97 $\pm$ 2,06	6,40 $\pm$ 1,83
	♀ NaCl	19,61 $\pm$ 4,27	41,54 $\pm$ 7,75	7,26 $\pm$ 2,26	4,46 $\pm$ 1,57
	♀ LPS	12,18 $\pm$ 1,92	129,82 $\pm$ 29,19	7,51 $\pm$ 1,63	6,05 $\pm$ 2,08
IFN- γ pg/ml	♂ NaCl	18,06 $\pm$ 4,38	17,21 $\pm$ 7,83	4,24 $\pm$ 1,84	6,30 $\pm$ 1,57
	♂ LPS	34,85 $\pm$ 12,70	102,36 $\pm$ 23,42	130,74 $\pm$ 57,75	11,21 $\pm$ 2,41
	♀ NaCl	nie wykryto	15,44 $\pm$ 3,97	0,32 $\pm$ 0,33	7,33 $\pm$ 4,34
	♀ LPS	nie wykryto	28,05 $\pm$ 10,42	41,14 $\pm$ 28,02	5,27 $\pm$ 1,84

Analizę statystyczną przeprowadzano dla każdego białka osobno, biorąc pod uwagę trzy czynniki: podaną substancję, płeć oraz czas. Ze względu na duże rozrzuty danych wokół mediany stosowano test Kruskala-Wallisa w celu oceny efektu każdego z badanych czynników. Najważniejsze pytanie dotyczyło tego, czy podanie LPS wpływa na stężenie wybranych białek, dlatego podczas dalszej analizy wielokrotnymi testami Manna-Whitneya porównano wyłącznie grupy różniące się czynnikiem podana substancja. Pierwszym analizowanym białkiem było MMP-9. Analiza stężeń wykazała istotny wpływ czynnika substancji ($H_1 = 34,931$; $p < 0,0001$), natomiast zmienne czas oraz płeć okazały się nieistotne (czas: $H_3 = 2,532$; $p > 0,05$; płeć: $H_1 = 0,009$; $p > 0,05$). Porównania między grupami wykazały, podwyższone stężenia białka MMP-9, 0,5 godz., 2 oraz 6 godzin po podaniu LPS w surowicy samców w porównaniu do kontroli NaCl (0,5 godz.: $U = 0,00$; $p < 0,01$; 2 godz.: $U = 0,000$; $p < 0,01$; 6 godz.: $U = 4,00$; $p < 0,05$). W grupach samic wykryto podwyższony poziom białka MMP-9 0,5 oraz 6 godzin po iniekcji w porównaniu do samic NaCl (0,5 godz.: $U = 0,00$; $p < 0,01$; 6 godz.: $U = 0,00$; $p < 0,01$). Tylko w przypadku białka MMP-2, dane spełniały założenia pozwalające na przeprowadzenie wieloczynnikowej ANOVA, dlatego też oprócz wpływu zmiennych niezależnych, obliczono efekty interakcji poszczególnych parametrów. Analiza stężeń białka MMP-2 nie wykryła istotnego efektu podanej substancji, płci ani czasu po podaniu, interakcje między czynnikami również okazały się być nieistotne (czas: $F_{3, 79} = 2,925$; $p > 0,05$; substancja: $F_{1, 79} = 2,856$; $p > 0,05$; płeć: $F_{1, 79} = 0,722$; $p > 0,05$; czas x substancja: $F_{3, 79} = 0,976$; $p > 0,05$; czas x płeć: $F_{3, 79} = 0,642$; $p > 0,05$; substancja x płeć: $F_{1, 79} = 0,176$; $p > 0,05$; czas x substancja x płeć: $F_{3, 79} = 1,089$; $p > 0,05$). Kolejnym badanym białkiem było TIMP-1. Testowanie statystyczne wykazało wpływ zarówno podanej substancji ($H_1 = 22,98$; $p < 0,0001$) jak i płci ($H_1 = 13,522$; $p < 0,001$), nie wykryto natomiast wpływu czasu ($H_3 = 3,471$; $p > 0,05$) na obserwowany efekt. Podczas analizy wielokrotnymi testami Manna-Whitneya odnotowano wyższe stężenie białka TIMP-1, w surowicy samców, 2 oraz 24 godziny po podaniu LPS w porównaniu do samców NaCl w tych samych punktach czasowych (2 godz.: $U = 2,00$; $p < 0,001$; 24 godz.: $U = 0,00$; $p < 0,001$). Porównania wykonane między grupami samic NaCl i LPS wykazały podwyższone stężenie badanego analitu 6 oraz 24 godziny po iniekcji LPS (6 godz.: $U = 4,00$; $p < 0,05$; 24 godz. $U = 5,00$; $p < 0,05$).





Ryc. 4.14. Stężenie białek w surowicy osesków myszy B6 mierzone z wykorzystaniem zestawu Luminex®. Pomiaru dokonano w czterech punktach czasowych po podaniu LPS lub NaCl. Pół godziny po iniekcji zaobserwowano wzrost stężenia MMP-9 w surowicy osesków z grupy LPS, dodatkowo tylko u samców wykazano podwyższone stężenie CCL5 w tym punkcie czasowym. Największe różnice zaobserwowano 2 godziny po podaniu LPS, u obu płci stężenia CCL5, TNF- α , IL-6 oraz IL-10 były podwyższone. Dodatkowo, w grupie samców zaobserwowano wyższy poziom MMP-9, TIMP-1 oraz IFN- γ w tym punkcie czasowym. W trzecim punkcie czasowym, 6 godzin po podaniu LPS u obu płci zauważono podwyższony poziom MMP-9, a dodatkowo u samic z grupy LPS podwyższony poziom TIMP-1. Dobę po iniekcji LPS u obu płci zaobserwowano podwyższony poziom TIMP-1, a dodatkowo w surowicy samic LPS wyższe stężenie CCL5. W punkcie czasowym 0,5 godziny nie wykryto IFN- γ w surowicy samic, co na wykresie oznaczono jako nd (ang. *not detected*, nie wykryto). Na wykresach * oznacza $p \leq 0,05$; a ** oznacza $p \leq 0,01$. W celu uzyskania odpowiedniej objętości materiału, każdą próbkę uzyskano poprzez wymieszanie surowicy dwóch zwierząt. Liczebność dla wszystkich grup wynosiła $n = 6$, z wyjątkiem ♀ 24 godz. LPS $n = 5$, gdzie n = liczba próbek.

Następnie przetestowano poziomy białka CCL5. Analiza Kruskala-Wallisa wykazała istotny wpływ podanej substancji ($H_1 = 16,372$; $p < 0,001$) oraz czasu jaki upłynął od iniekcji ($H_3 = 13,987$; $p < 0,01$) na obserwowane efekty, nie wykryto natomiast istotności czynnika płci ($H_1 = 0,015$; $p > 0,05$). Przy użyciu wielokrotnych testów Manna-Whitneya odkryto wzrost stężenia białka w punktach czasowych 0,5 oraz 2 godziny w surowicy samców LPS w porównaniu do NaCl (0,5 h: $U = 5,00$; $p < 0,05$; 2 godz.: $U = 1,00$; $p < 0,01$). Natomiast porównania w grupie samic wykazały wyższe stężenie analitu 2 oraz 24 godziny po podaniu LPS w porównaniu do grup kontrolnych (2 godz.: $U = 3,00$; $p < 0,05$; 24 godz.: $U = 1,00$; $p < 0,05$). Analiza Kruskala-Wallisa przeprowadzona dla stężeń białka TNF- α wykazała istotny wpływ zmiennej czas ($H_3 = 51,863$; $p < 0,0001$), ale nie zmiennej płci ($H_1 = 1,04$; $p > 0,05$) ani zmiennej substancja ($H_1 = 2,479$; $p > 0,05$). Porównania między grupami wykazały, że w punkcie czasowym 2 godziny, zarówno w grupie samic jak i samców LPS, stężenie TNF- α było wyższe w porównaniu do grup traktowanych NaCl (samce: $U = 0,00$; $p < 0,01$; samice: $U = 4,00$; $p < 0,05$). W przypadku białka IL-6, analiza Kruskala-Wallisa również wykazała wpływ czynnika czasu ($H_3 = 61,468$; $p < 0,0001$), ale nie czynników płci i podanej substancji (płeć: $H_1 = 0,617$; $p > 0,05$; podana substancja: $H_1 = 0,522$; $p > 0,05$). Przy porównywaniu grup stwierdzono wyższe stężenie IL-6, 2 godziny po iniekcji LPS, zarówno w grupie samic, jak i samców w porównaniu do kontroli NaCl (samce: $U = 0,00$; $p < 0,01$; samice: $U = 4,00$; $p < 0,05$). Następnym badanym białkiem było IL-10, tak jak w przypadku TNF- α i IL-6, jedyną zmienną, której wpływ zidentyfikowano jako istotny dla obserwowanego efektu był czas (czas: $H_3 = 64,717$; $p < 0,0001$; płć: $H_1 = 0,234$; $p > 0,05$; podana substancja: $H_1 = 0,838$; $p > 0,05$). Wyższe stężenie IL-10 w surowicy wykryto dwie godziny po iniekcji LPS zarówno w grupie samic jak i samców w porównaniu do grup kontrolnych NaCl (samce: $U = 3,00$; $p < 0,05$; samice: $U = 4,00$; $p < 0,05$). Ostatnim badanym białkiem był IFN- γ . Również w tym przypadku wykryto wpływ czasu ($H_3 = 13,854$; $p < 0,01$). Dodatkowo płć oraz podana substancja okazały się być istotnymi czynnikami dla obserwowanego efektu (płć: $H_1 = 14,969$; $p < 0,001$; substancja: $H_1 = 7,939$; $p < 0,01$). Co warto zauważyć, w surowicy samic 0,5 godzin po iniekcji zarówno NaCl, jak i LPS nie wykryto IFN- γ . Porównania między grupami ujawniły wyższe stężenie IFN- γ w grupie samców LPS dwie godziny po iniekcji w porównaniu do grupy NaCl ($U = 2,00$; $p < 0,05$).

Podsumowując, najwcześniej tj. 0,5 godziny po iniekcji, wzrosło stężenie MMP-9 i CCL5 w surowicy samców LPS, a także w MMP-9 w surowicy samic LPS. Najwięcej zmian zaobserwowano 2 godziny po podaniu LPS. W grupie samców podwyższony

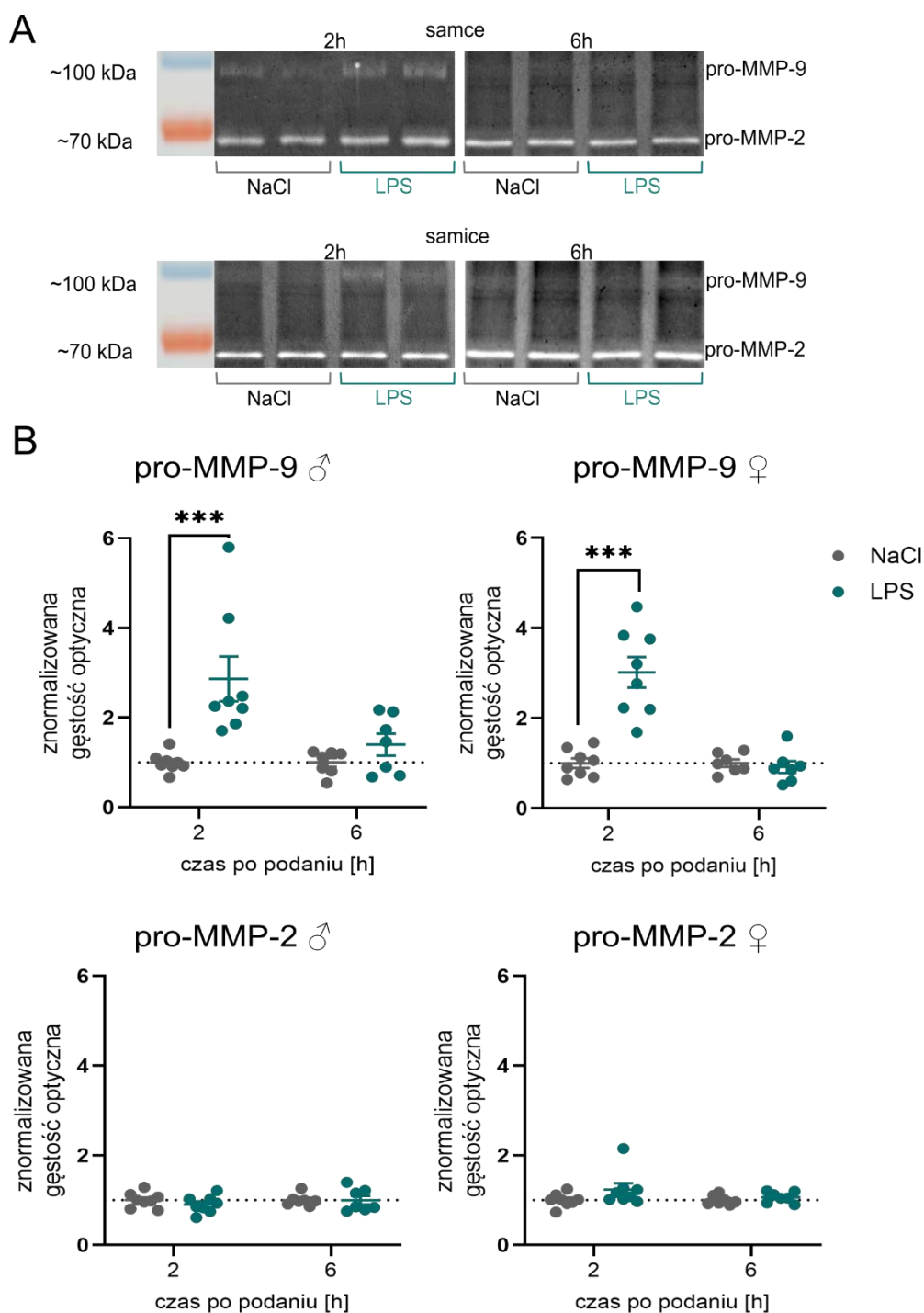
poziom zanotowano dla wszystkich wykrytych analitów z wyjątkiem MMP-2, natomiast u samic po 2 godzinach wyższą koncentrację stwierdzono w przypadku: CCL5, TNF- α , IL-6 oraz IL-10. Po 6 godzinach u obu płci odnotowano wzrost stężenia MMP-9, natomiast po dobie od iniekcji podwyższony poziom stwierdzono w przypadku inhibitora proteaz TIMP-1, a u samic dodatkowo w przypadku CCL5. W przypadku 7-dniowych samic odpowiedź układu odpornościowego była uboższa w porównaniu do samców, np. w przypadku IFN- γ w ogóle nie wykryto wzrostu stężenia w surowicy samic. Nawet w przypadku kiedy u obu płci wykryto podwyższony poziom danego białka, różnice między grupą LPS a NaCl były większe w przypadku samców (CCL5, TNF- α , IL-6).

4.2.2 Aktywność żelatynolityczna w OUN

Jednym z białek, którego podwyższone stężenie zanotowano w surowicy osesków było MMP-9. Białko to pełni szereg funkcji podczas procesu zapalnego, np. uczestniczy w przebudowie tkanek w celu ułatwienia napływu limfocytów do miejsca infekcji, a także reguluje inne białka odpowiedzi odpornościowej, takich jak TNF- α czy IL-1 β ^{146,188}. MMP-9 jest jednak szczególnie interesujące ze względu na udział w procesach neuroplastyczności, które wydają się wyjątkowo ważne w zrozumieniu mechanizmów zaburzeń neurorozwojowych¹⁶⁶. Do grupy żelatynaz, oprócz MMP-9, należy białko MMP-2, z tego względu przeanalizowano również jego aktywność, pomimo że we krwi nie zaobserwowano różnic w poziomie tego białka. Wybrane tkanki pobrano dwie oraz sześć godzin po iniekcji LPS. W pierwszej kolejności postanowiono przeanalizować aktywność żelatynolityczną w przednich częściach kory mózgu. Jak zaprezentowano w rozdziale 3., przejaśnienia w żelu widoczne po degradacji żelatyny mogą być widoczne w czterech różnych miejscach odpowiadających formom latentnym białek (pro-MMP-9, pro-MMP-2) oraz formom aktywnym z odkrytymi miejscami cięcia¹⁴⁹. W badanych próbkach przednich części kory mózgu oraz hipokampów zaobserwowano wyłącznie aktywność pro-MMP-9 oraz pro-MMP-2. Ze względu na zastosowane barwienie żeli, możliwe było znormalizowanie wartości densytometrycznej każdej próbki do całkowitego stężenia białka w paśmie żelu (ang. *lane*), a także do grupy kontrolnej. Było to konieczne ponieważ doświadczenia przeprowadzano na dwóch różnych kohortach zwierząt.

W pierwszej kolejności postanowiono przeanalizować aktywność żelatynolityczną w przednich częściach kory mózgu. Przykładowe zymogramy przedstawiono na panelu A ryciny 4.15., natomiast wykresy przedstawiające znormalizowane wartości gęstości optycznej dla wykrytych żelatynaz przedstawiono na panelu B ryciny 4.15. Średnie

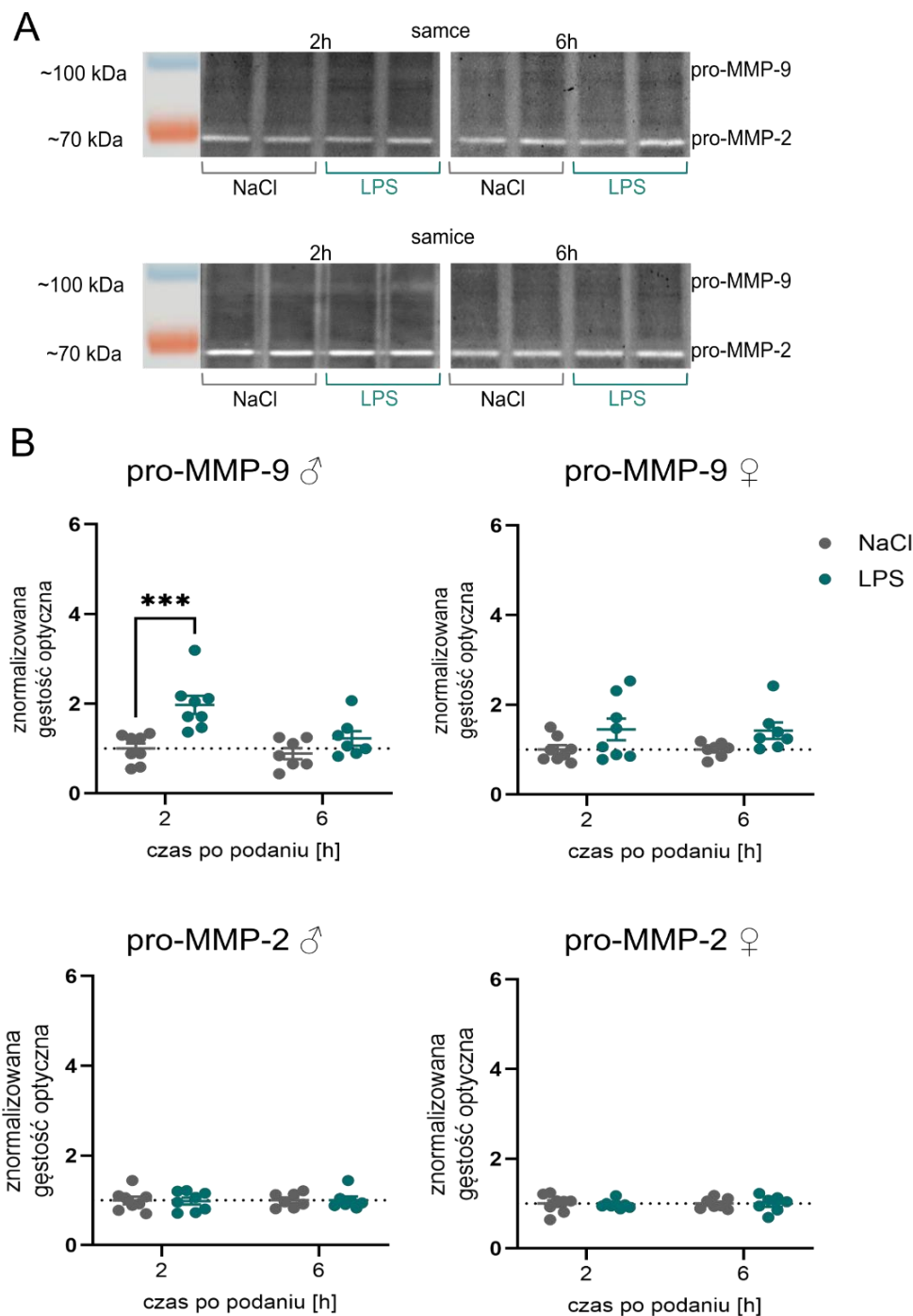
wartości zmierzone na wysokości białka pro-MMP-9 wynosiły kolejno: ♂ 2 godz. NaCl $1,000 \pm 0,074$; ♂ 2 godz. LPS $2,861 \pm 0,499$; ♂ 6 godz. NaCl $1,000 \pm 0,099$; ♂ 6 godz. LPS $1,397 \pm 0,244$; ♀ 2 godz. NaCl $1,000 \pm 0,107$; ♀ 2 godz. LPS $3,019 \pm 0,341$; ♀ 6 godz. NaCl $1,000 \pm 0,081$; ♀ 6 godz. LPS $0,918 \pm 0,133$; natomiast dla białka pro-MMP-2: ♂ 2 godz. NaCl $1,000 \pm 0,059$; ♂ 2 godz. LPS $0,905 \pm 0,066$; ♂ 6 godz. NaCl $1,000 \pm 0,049$; ♂ 6 godz. LPS $0,999 \pm 0,096$; ♀ 2 godz. NaCl $1,000 \pm 0,053$; ♀ 2 godz. LPS $1,239 \pm 0,136$; ♀ 6 godz. NaCl $1,000 \pm 0,040$; ♀ 6 godz. LPS $1,065 \pm 0,045$. Analiza statystyczna przeprowadzona dla aktywności białka pro-MMP-9 wykazała istotny wpływ czynnika „podana substancja” ($H_1 = 13,228$; $p < 0,001$), a także czasu ($H_1 = 9,868$; $p < 0,01$). Płeć zwierząt nie miała istotnego wpływu na obserwowany efekt ($H_1 = 0,463$; $p > 0,05$). Po przeprowadzeniu testów Manna-Whitneya okazało się, że wzrost aktywności żelatynolitycznej zaobserwowano 2 godziny po iniekcji LPS zarówno w przypadku samców ($U = 0,00$; $p < 0,001$), jak i samic ($U = 0,00$; $p < 0,001$). Natomiast sześć godzin po podaniu LPS nie zauważono różnic między grupami. Przeanalizowanie aktywności żelatynolitycznej białka pro-MMP-2 nie wykazało istotności żadnego z badanych czynników (płeć: $H_1 = 3,525$; $p > 0,05$; substancja: $H_1 = 0,661$; $p > 0,05$; czas: $H_1 = 0,043$; $p > 0,05$). Podanie LPS nie miało wpływu na aktywność białka pro-MMP-2.



Ryc. 4.15. Aktywność żelatynolityczna w korze mózgu siedmiodniowych myszy po iniekcji LPS lub NaCl. **A.** Przykładowe zymogramy przedstawiające aktywność enzymatyczną żelatynaz 2 oraz 6 godzin po iniekcji. **B.** Wyniki zymografii żelowej w formie znormalizowanej gęstości optycznej. Dwie godziny po podaniu LPS, u obu płci, zaobserwowano zwiększoną aktywność żelatynolityczną na wysokości białka pro-MMP-9 w porównaniu do kontroli. Na wykresach *** oznacza $p \leq 0,001$. Liczebność każdej z grup wynosiła $n = 8$ w punkcie czasowym 2 godz. oraz $n = 7$ w punkcie czasowym 6 godz., gdzie n = liczba próbek.

Następnie poddano analizie dane uzyskane z hipokampów osesków. Wyniki w formie przykładowych zymogramów przedstawiono na panelu A ryciny 4.16., a wykresy przedstawiające znormalizowane wartości densytometryczne na panelu B 4.16. Średnie wartości dla pro-MMP-9 wynosiły: ♂ 2 godz. NaCl $1,000 \pm 0,113$; ♂ 2 godz. LPS $1,974 \pm 0,203$; ♂ 6 godz. NaCl $1,000 \pm 0,122$; ♂ 6 godz. LPS $1,227 \pm 0,162$; ♀ 2 godz. NaCl $1,000 \pm 0,098$; ♀ 2 godz. LPS $1,452 \pm 0,241$; ♀ 6 godz. NaCl $1,000 \pm 0,060$; ♀ 6 godz. LPS $1,426 \pm 0,181$; natomiast dla białka pro-MMP-2: ♂ 2 godz. NaCl $1,000 \pm 0,081$; ♂ 2 godz. LPS $0,981 \pm 0,074$; ♂ 6 godz. NaCl $1,000 \pm 0,060$; ♂ 6 godz. LPS $1,005 \pm 0,077$; ♀ 2 godz. NaCl $1,000 \pm 0,071$; ♀ 2 godz. LPS $0,974 \pm 0,031$; ♀ 6 godz. NaCl $1,000 \pm 0,044$; ♀ 6 godz. LPS $0,997 \pm 0,068$. Analizując aktywność na wysokości białka pro-MMP-9 wykryto wpływ podanej substancji ($H_1 = 16,290$; $p < 0,001$), ale nie płci ($H_1 = 0,159$; $p > 0,05$), ani czasu ($H_1 = 1,405$; $p > 0,05$). Dzięki porównaniom między grupami odkryto, że podanie LPS powoduje zwiększoną aktywność enzymatyczną na wysokości białka pro-MMP-9 wyłącznie w grupie samców, 2 godziny po iniekcji ($U = 0,00$; $p < 0,001$). Tak jak w przypadku przednich części mózgu, nie wykryto zmian w aktywności żelatynolitycznej pro-MMP-2 po podaniu czynnika bakteryjnego (płeć: $H_1 = 0,106$; $p > 0,05$; substancja: $H_1 = 0,049$; $p > 0,05$; czas: $H_1 = 0,004$; $p > 0,05$).

Uzyskane dane potwierdziły udział białka MMP-9 w rozwoju procesów zapalnych nie tylko we krwi, ale także w mózgu. Szczególnie widoczne było to 2 godziny po iniekcji LPS w mózgach samców, u których zaobserwowano podwyższoną aktywność enzymatyczną na wysokości latentnej formy tego białka w obu badanych strukturach. U samic wzrost działania żelatynaz ograniczony był do przednich części kory mózgu.



Ryc. 4.16. Aktywność żelatynolityczna w hipokampach siedmiodniowych myszy po iniekcji LPS lub NaCl. A. Przykładowe zymogramy przedstawiające aktywność enzymatyczną żelatynaz 2 oraz 6 godzin po iniekcji. **B.** Wyniki zymografii żelowej w formie znormalizowanej gęstości optycznej. Dwie godziny po podaniu LPS w grupie samców zaobserwowano podwyższoną aktywność żelatynolityczną na wysokości białka pro-MMP-9 w porównaniu do kontroli. Na wykresach *** oznacza $p \leq 0,001$. Liczebność każdej z grup wynosiła $n = 8$ w punkcie czasowym 2 godz. oraz $n = 7$ w punkcie czasowym 6 godz., gdzie n = liczba próbek.

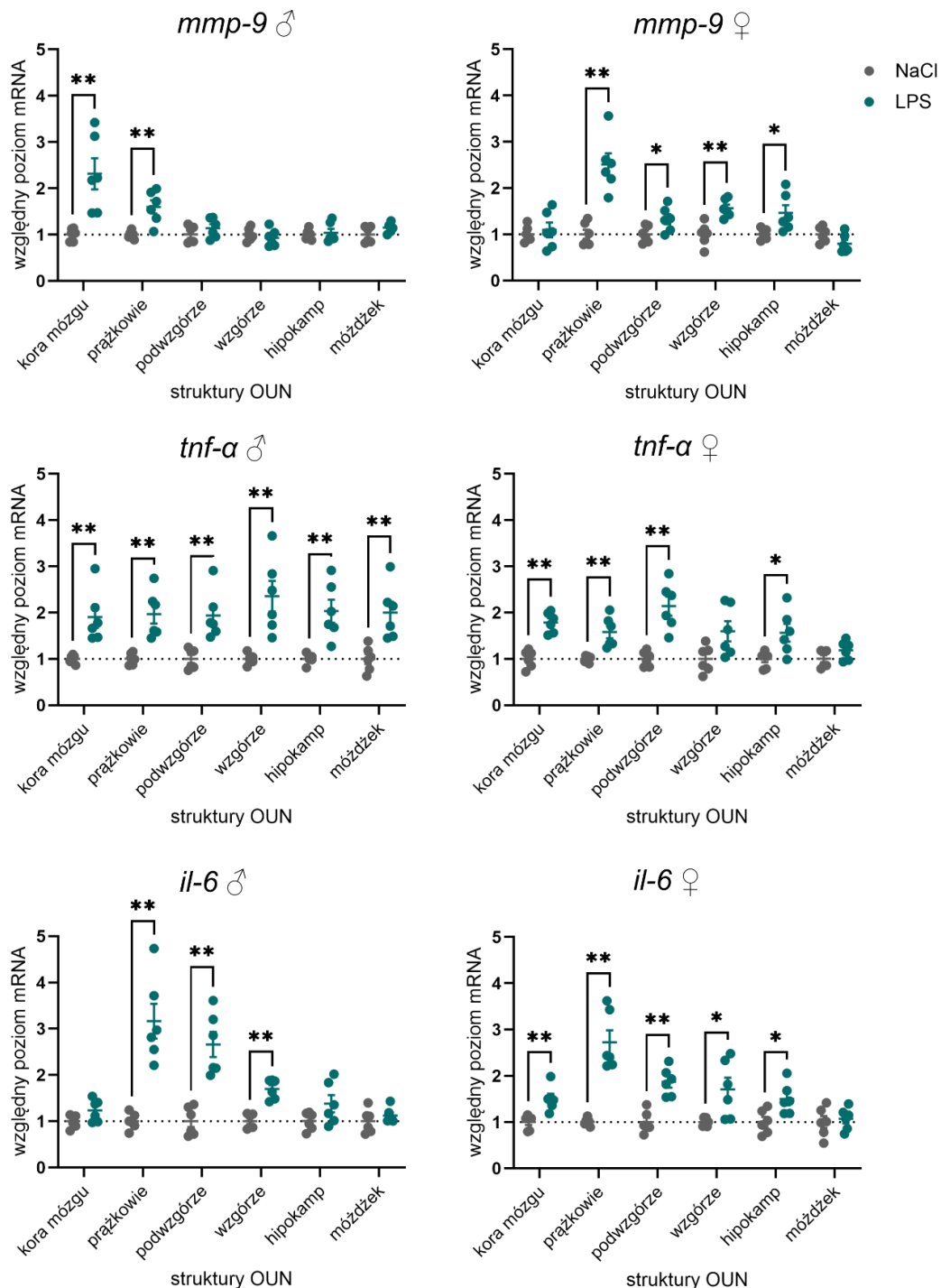
4.2.3 Ekspresja genów związanych z odpowiedzią układu odpornościowego w różnych strukturach OUN

Kolejnym krokiem było sprawdzenie, czy stan zapalny wywołany jednorazowym podaniem LPS ma wpływ na ekspresję genów w OUN. Na podstawie danych opisanych w poprzedniej części zdecydowano się na sprawdzenie poziomu ekspresji genu *mmp-9*. Oprócz tego zbadano poziomy mRNA *tnf-α* oraz *il-6*. Postanowiono sprawdzić sześć struktur OUN przedstawionych zgodnie z kolejnością dysekcji (przednia część kory mózgu, prążkowie, podwzgórze, wzgórze, hipokamp oraz mózdzek) 6 godzin po iniekcji. Średnie względne poziomy mRNA dla każdej z grup przedstawiono w tabeli 4.2., natomiast wykresy i porównania między grupami znajdują się na rycinie 4.18.

Tabela 4.2. Względne poziomy ekspresji badanych genów. Wyniki normalizowano metodą $\Delta\Delta Ct$ używając *gapdh* jako genu referencyjnego. Dane przedstawiono jako średnia $\pm$ SEM.

Gen	Grupa	Struktura					
		kora mózgu	prążkowie	podwzgórze	wzgórze	hipokamp	mózdzek
<i>mmp-9</i>	♂ NaCl	1,00 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,07
	♂ LPS	2,32 $\pm$ 0,33	1,60 $\pm$ 0,14	1,14 $\pm$ 0,09	0,93 $\pm$ 0,08	1,04 $\pm$ 0,09	1,15 $\pm$ 0,04
	♀ NaCl	1,00 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,07
	♀ LPS	1,10 $\pm$ 0,16	2,50 $\pm$ 0,24	1,33 $\pm$ 0,11	1,56 $\pm$ 0,08	1,46 $\pm$ 0,16	0,79 $\pm$ 0,08
<i>tnf-α</i>	♂ NaCl	1,00 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,09	1,00 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,11
	♂ LPS	1,91 $\pm$ 0,23	1,97 $\pm$ 0,20	1,94 $\pm$ 0,21	2,36 $\pm$ 0,33	2,03 $\pm$ 0,25	2,00 $\pm$ 0,24
	♀ NaCl	1,00 $\pm$ 0,80	1,00 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,12	1,00 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,08
	♀ LPS	1,79 $\pm$ 0,09	1,58 $\pm$ 0,13	2,14 $\pm$ 0,20	1,60 $\pm$ 0,22	1,57 $\pm$ 0,19	1,19 $\pm$ 0,08
<i>il-6</i>	♂ NaCl	1,00 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,12	1,00 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,10
	♂ LPS	1,23 $\pm$ 0,10	3,17 $\pm$ 0,37	2,66 $\pm$ 0,27	1,70 $\pm$ 0,09	1,38 $\pm$ 0,19	1,12 $\pm$ 0,07
	♀ NaCl	1,00 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,09	1,00 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0,13
	♀ LPS	1,51 $\pm$ 0,11	2,73 $\pm$ 0,26	1,87 $\pm$ 0,12	1,71 $\pm$ 0,25	1,50 $\pm$ 0,13	1,07 $\pm$ 0,10

W pierwszej kolejności skupiono się na ekspresji *mmp-9*. Wstępna analiza statystyczna wykazała, że to głównie czynnik „podana substancja” ma wpływ na obserwowany efekt ($H_1 = 24,152$; $p < 0,001$), natomiast zmienna „struktura” oraz „płeć” nie przekroczyły progu istotności statystycznej (struktura: $H_5 = 9,190$; $p > 0,05$; płeć: $H_1 = 0,183$; $p > 0,05$). W grupie samców LPS podwyższony poziom ekspresji *mmp-9* względem kontroli stwierdzono w przednich częściach kory mózgu ($U = 0,00$; $p < 0,01$) oraz w prążkowiach ($U = 1,00$; $p < 0,01$). W mózgach samic traktowanych LPS podwyższony poziom mRNA *mmp-9* odkryto



Ryc. 4.18. Względna ekspresja genów *mmp-9*, *il-6* oraz *tnfr-α* w różnych strukturach OUN 6 godzin po iniekcji. Podanie LPS prowadzi do wzrostu ekspresji *mmp-9* w prążkowiach obu płci. Dodatkowo, wzrost ekspresji tego genu zaobserwowano w przednich częściach kory mózgu samców, a u samic wzrost zanotowano w podwzgórzach, wzgórzach i hipokampach. Podwyższoną ekspresję *tnfr-α* zaobserwowano we wszystkich badanych strukturach mózgu w grupie samców LPS, natomiast w OUN samic podwyższony poziom *tnfr-α* wykryto w korze mózgu, prążkowiach, podwzgórzach oraz hipokampach. Wzrost ekspresji *il-6* zaobserwowano w prążkowiach, podwzgórzach oraz wzgórzach obu płci 6 godzin po podaniu LPS. Dodatkowo, w grupie samic podwyższoną ekspresję *il-6* zanotowano także w korze mózgu oraz hipokampie. Na wykresach * oraz ** oznacza kolejno: $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$. Liczebność dla każdej z grup wynosiła $n = 6$, gdzie n = liczba próbek.

aż w czterech strukturach: prążkowi (U = 0,00; p < 0,01), podwzgórzu (U = 5,00; p < 0,05), wzgórzu (U = 1,00; p < 0,01) oraz w hipokampie (U = 3,00; p < 0,05).

Kolejnym genem, którego ekspresję sprawdzono był *tnf-α*. Przy użyciu testu Kruskala-Wallisa stwierdzono istotny wpływ podanej substancji (H₁ = 89,972; p < 0,0001). Zmienna „płeć” (H₁ = 1,770; p > 0,05) oraz „struktura” (H₅ = 1,564; p < 0,05) nie okazały się być istotne dla obserwowanego efektu. Testy wielokrotnych porównań wykazały, że u samców po podaniu LPS we wszystkich strukturach zaobserwowano podwyższony względny poziom mRNA *tnf-α* (we wszystkich przypadkach wartość U wynosiła 0,00; przy istotności p < 0,01). W grupie samic wzrost ekspresji badanego genu zanotowano po iniekcji LPS w przednich częściach kory mózgu (U = 0,00; p < 0,01), w prążkowi (U = 0,00; p < 0,01), w podwzgórzu (U = 0,00; p < 0,01) oraz w hipokampie (U = 4,00; p < 0,05).

Ostatnim genem, którego ekspresję badano po podaniu LPS była *il-6*. Wstępnie stwierdzono istotny wpływ podanej substancji (H₁ = 62,713; p < 0,0001) oraz struktury, z której wyizolowano materiał genetyczny na ekspresję genu (H₅ = 12,780; p < 0,05). Nie wykazano jednak istotności czynnik płci (H₁ = 0,012; p > 0,05). Dzięki porównaniom między grupami odkryto istotnie podwyższony względny poziom mRNA *il-6* w prążkowiach (U = 0,00; p < 0,01), podwzgórzach (U = 0,00; p < 0,01) oraz wzgórzach (U = 0,00; p < 0,01) samców, którym podano LPS. W mózgach samic poddanych aktywacji układu odpornościowego wykryto podwyższoną ekspresję *il-6* w korze mózgu (U = 0,00; p < 0,01); prążkowiach (U = 0,00; p < 0,01); podwzgórzach (U = 0,00; p < 0,01), wzgórzach (U = 4,00; p < 0,05) oraz hipokampach (U = 4,00; p < 0,05).

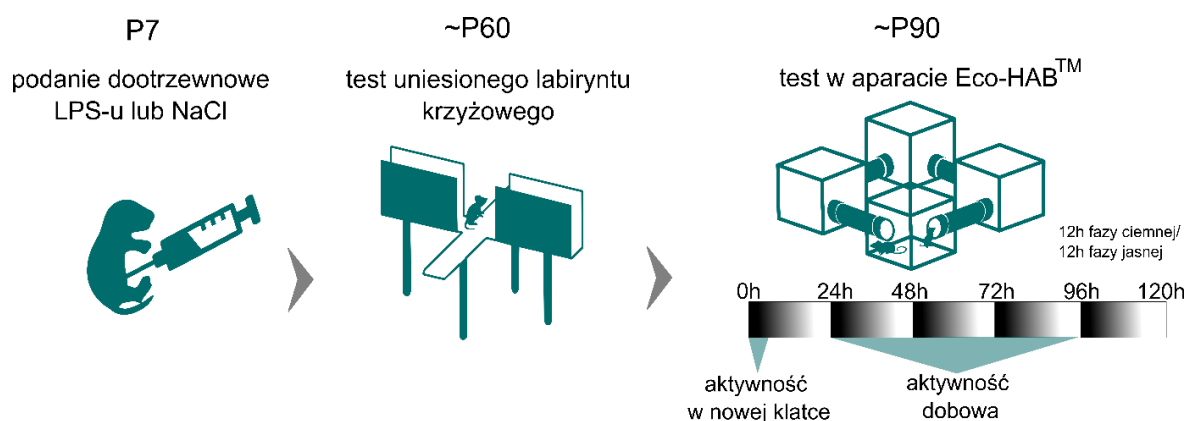
Podsumowując, w OUN ekspresja genów związanych z odpowiedzią na czynnik zapalny była podwyższona po 6 godzinach od i.p. iniekcji LPS. U samic i u samców wzrost ekspresji badanych genów obserwowano w różnych strukturach. Przykładem może być gen *mmp-9*, którego poziom w mózgu samców zanotowano w przednich częściach kory mózgu i prążkowi, a u samic w prążkowi, podwzgórzu, wzgórzu i hipokampie. Takie różnice mogą wynikać z odmiennej dynamiki zmian ekspresji genów, której nie udało się uchwycić z powodu analizy efektu czynnika zapalnego tylko w jednym punkcie czasowym.

4.3 Rola MMP-9 w kształtowaniu zachowania dorosłych myszy po wczesnej aktywacji układu odpornościowego

Wcześniejsze badania zebrane w pracy przeglądowej Reinhard i współpracowników¹⁸⁹, podkreślały współwystępowanie wysokiego poziomu MMP-9 z kluczowymi procesami w rozwoju mózgu. Za przykład może posłużyć stabilizacja włókien kiciastych w hipokampie, niższe stężenie białka podczas tego procesu wiązało się z przyspieszonym dojrzewaniem synaps pobudzających^{190,191}. W niniejszej rozprawie udało się wykazać podwyższony poziom białka MMP-9 we krwi, podwyższoną ekspresję genu, a także wzrost aktywności żelatynolitycznej w mózgu po podaniu LPS. W pracy opisano również utrzymujące się w dorosłości zmiany w zachowaniu zwierząt poddanych stymulacji układu odpornościowego w siódmym dniu po urodzeniu. Aby sprawdzić, czy obserwowane zmiany w zachowaniu są modulowane przez MMP-9, zdecydowano się na przeprowadzenie obserwacji behawioralnej zwierząt MMP-9 KO oraz ich genetycznie niezmienionego rodzeństwa WT po podaniu czynnika bakteryjnego w siódmym dniu życia. Zdecydowano się na zastosowanie tej samej baterii testów behawioralnych, które przeprowadzono na zwierzętach B6.

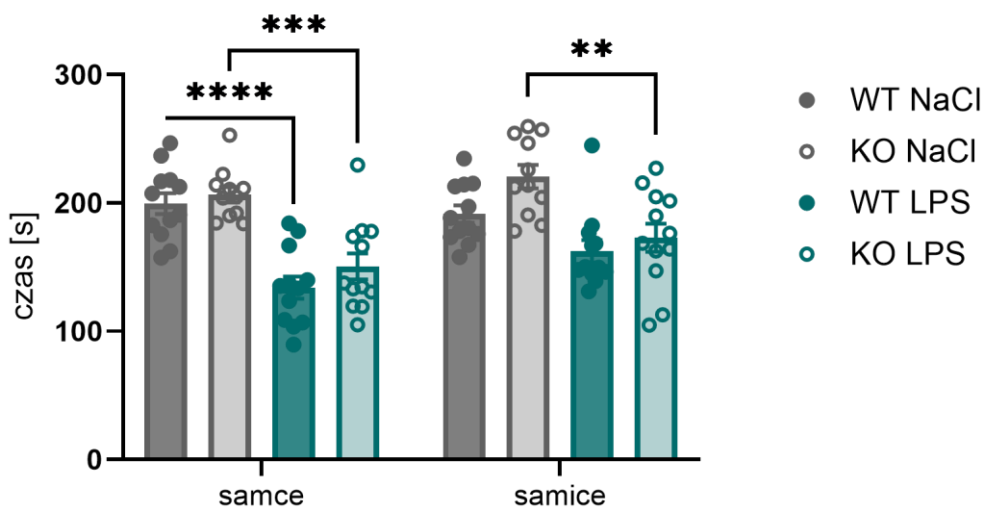
4.3.1 Aktywność zwierząt linii MMP-9 KO

W pierwszej kolejności analizie poddano aktywność zwierząt linii MMP-9 KO. Wykorzystane testy i wiek zwierząt przedstawiono na rycinie 4.19.



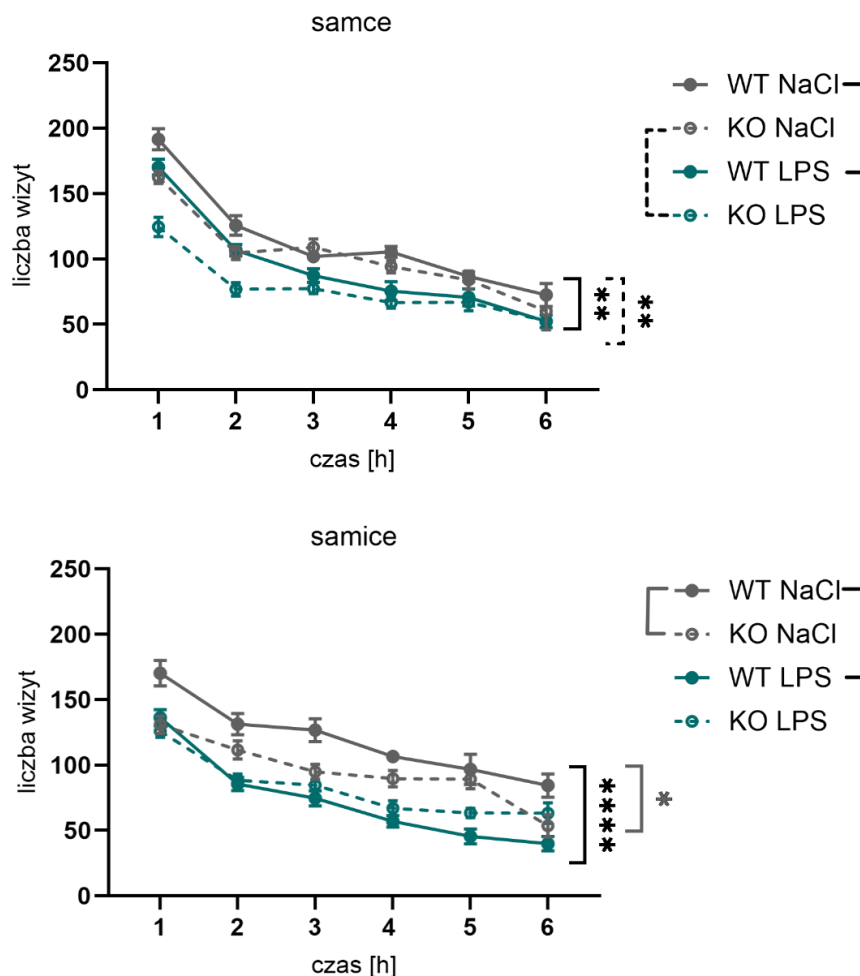
Ryc. 4.19. Testy behawioralne, podczas których mierzono aktywność w różnych warunkach. Nad schematami testów podano wiek zwierząt w czasie przeprowadzenia doświadczenia.

Podczas testu EPM mierzono między innymi aktywność myszy linii MMP-9 KO. Średni czas (s) spędzony na aktywności wynosił kolejno: ♂ WT NaCl $199,5 \pm 8,14$; ♂ KO NaCl $206,4 \pm 6,02$; ♂ WT LPS $134,0 \pm 8,69$; ♂ KO LPS $150,50 \pm 10,19$; ♀ WT NaCl $191,3 \pm 6,76$; ♀ KO NaCl $220,5 \pm 9,14$; ♀ WT LPS $162,4 \pm 8,73$; ♀ KO LPS $173,0 \pm 11,01$. Porównania między grupami przedstawiono na rycinie 4.20. Uzyskane dane analizowano przy pomocy trójczynnika ANOVA (substancja, genotyp, płeć). Wykryto istotny udział każdego z czynników (substancja: $F_{1, 86} = 63,620$ $p < 0,0001$; genotyp: $F_{1, 86} = 6,508$ $p < 0,05$; płeć: $F_{1, 86} = 5,237$; $p < 0,05$), ale nie interakcji między nimi (substancja x genotyp: $F_{1, 86} = 0,1344$; $p > 0,05$; substancja x płeć: $F_{1, 86} = 3,294$; $p > 0,05$; płeć x genotyp: $F_{1, 86} = 0,432$; $p > 0,05$; substancja x genotyp x płeć: $F_{1, 86} = 1,287$; $p > 0,05$). Testy *post-hoc* Šidáka wykazały, że bez względu na genotyp samce traktowane LPS były mniej aktywne w awersyjnym środowisku aparatu w porównaniu do samców NaCl (WT: $t = 5,339$; $p < 0,0001$; KO: $t = 4,462$; $p < 0,001$). W grupie samic różnice zauważono tylko w przypadku nokautów, samice KO LPS wykazały niższą aktywność w porównaniu do samic KO NaCl ($t = 3,789$; $p < 0,01$).



Ryc. 4.20. Aktywność zwierząt linii MMP-9 KO mierzona podczas 5 minut testu EPM. Samce po wczesnej aktywacji układu odpornościowego były mniej aktywne w porównaniu do kontroli bez względu na genotyp. W grupie samic zaobserwowano obniżoną aktywność po podaniu LPS wyłącznie u zwierząt KO. Na wykresie **, ***, **** oznacza kolejno: $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$; $p \leq 0,0001$. Liczebność grup: ♂ WT NaCl $n = 12$, ♂ KO NaCl $n = 11$, ♂ WT LPS $n = 12$, ♂ KO LPS $n = 12$, ♀ WT NaCl $n = 12$, ♀ KO NaCl $n = 11$, ♀ WT LPS $n = 12$, ♀ KO LPS $n = 12$, gdzie n = liczba zwierząt wykorzystanych w badaniu.

Aktywność w nowym środowisku mierzono także w aparacie Eco-HAB™. W odróżnieniu od testu EPM, zwierzęta eksplorowały klatkę w grupie do 13 osobników, które znały. W ciągu 6 godzin, zliczano co godzinę liczbę wizyt wykonanych między kompartmentami aparatu. Na podstawie tych danych wyliczono krzywą eksploracji i wartość AUC, którą wykorzystano do analizy statystycznej. Na rycinie 4.21. zaprezentowano średnią krzywą eksploracji dla każdej z grup, a w każdym punkcie czasowym średnią liczbę wizyt wykonała każda z badanych grup. Średnie wartości AUC dla grup wynosiły kolejno: ♂ WT NaCl $560,0 \pm 16,20$; ♂ KO NaCl $452,3 \pm 22,38$; ♂ WT LPS $500,8 \pm 25,78$; ♂ KO LPS $374,5 \pm 21,76$; ♀ WT NaCl $586,5 \pm 25,83$; ♀ KO NaCl $344,4 \pm 19,82$; ♀ WT LPS $477,6 \pm 23,0$; ♀ KO LPS $399,3 \pm 19,76$. Dzięki analizie metodą wieloczynnikowej ANOVA stwierdzono istotność podanej substancji ($F_{1,87} = 79,20$; $p < 0,0001$), genotypu zwierząt ($F_{1,87} = 9,394$; $p < 0,01$) oraz interakcji tych czynników ($F_{1,87} = 5,437$; $p < 0,05$). Wykryto również wpływ interakcji wszystkich trzech zmiennych (substancja x genotyp x płeć: $F_{1,87} = 8,568$; $p < 0,05$). Sam czynnik płci ($F_{1,87} = 1,646$; $p > 0,05$), współdziałanie czynników płci i substancji ($F_{1,87} = 1,918$; $p > 0,05$) oraz płci i genotypu ($F_{1,87} = 1,776$; $p > 0,05$) nie okazały się być istotne dla obserwowanego efektu. Testowanie *post-hoc* wykryło, że tak jak w przypadku testu EPM, samce po podaniu LPS, bez względu na genotyp, mniej aktywnie eksplorowały aparat Eco-HAB™ (WT: $t = 3,479$; $p < 0,01$; KO: $t = 4,078$; $p < 0,01$). Okazało się również, że samice NaCl z nieaktywnym białkiem MMP-9 mniej intensywnie eksplorowały nowe środowisko w porównaniu do samic WT NaCl ($t = 3,438$; $p < 0,05$). Oprócz tego, zauważono wpływ podania LPS na samice WT, zwierzęta poddane działaniu LPS były mniej aktywne podczas pierwszych 6 godzin w aparacie Eco-HAB™ ($t = 7,816$; $p < 0,0001$).

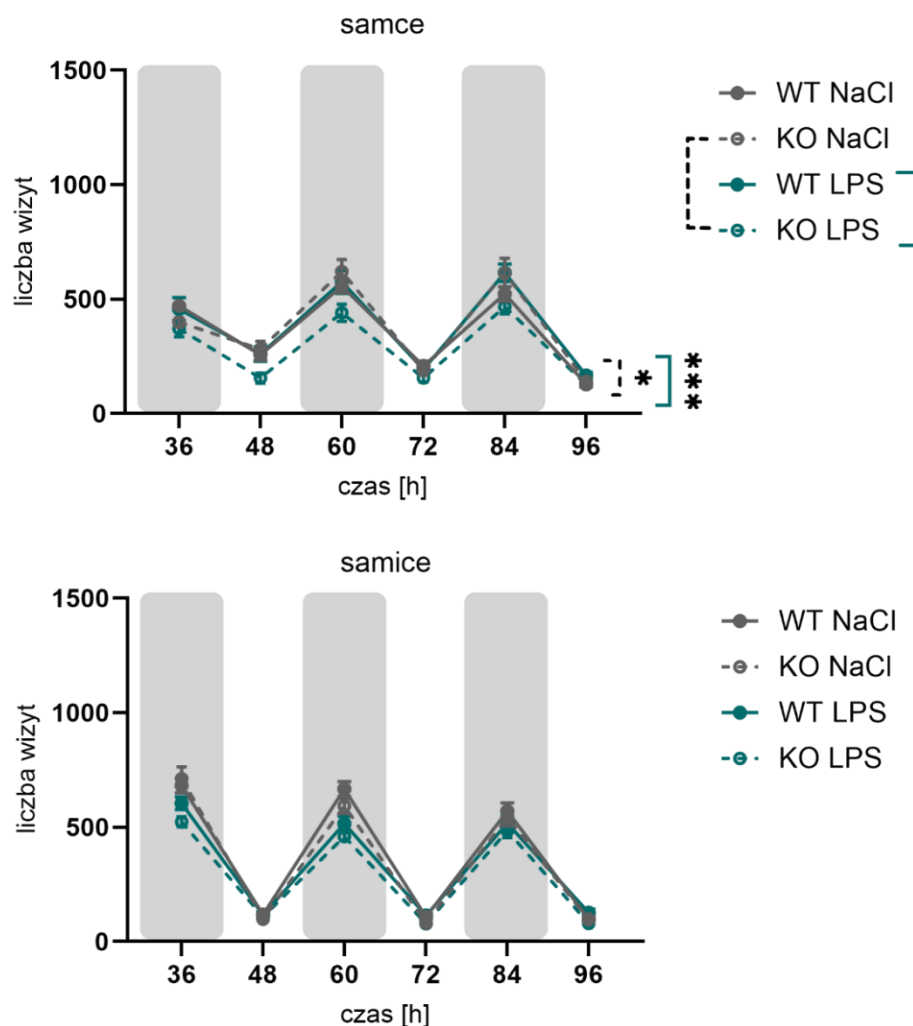


Ryc. 4.21. Aktywność zwierząt linii MMP-9 KO w nowym środowisku aparatu Eco-HAB™. W ciągu pierwszych sześciu godzin od rozpoczęcia testu co godzinę zliczano liczbę wizyt pomiędzy klatkami. Samce z grup traktowanych LPS mniej aktywnie eksplorowały nowe środowisko w porównaniu do grup traktowanych NaCl bez względu na genotyp. Natomiast w grupie samic WT zauważono obniżoną eksplorację po podaniu LPS. Dodatkowo, samice KO NaCl były mniej aktywne od samic WT NaCl. Na wykresach *, **, **** oznacza kolejno: $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ oraz $p \leq 0,0001$. Na legendzie pokazano sposób oznaczenia porównań między grupami. Liczebność grup: ♂ WT NaCl $n = 13$, ♂ KO NaCl $n = 11$, ♂ WT LPS $n = 13$, ♂ KO LPS $n = 13$, ♀ WT NaCl $n = 13$, ♀ KO NaCl $n = 11$, ♀ WT LPS $n = 13$, ♀ KO LPS $n = 13$, gdzie n = liczba zwierząt wykorzystanych w badaniu.

W aparacie Eco-HAB™ postanowiono również przeanalizować aktywność zwierząt linii MMP-9 KO już po habituacji do warunków aparatu. Pomiedzy drugim a czwartym dniem doświadczenia co 12 godzin zliczano wizyty między czterema klatkami aparatu. Cykl 12-godzinny odpowiadał fazom światła i ciemności w pomieszczeniu eksperymentalnym. Wykresy przedstawione na rycinie 4.22. pokazują aktywność dobową zwierząt w formie krzywej, gdzie każdy punkt reprezentuje liczbę wizyt wykonanych przez każdą z badanych grup w następujących po sobie cyklach (średnia $\pm$ SEM). Testowanie

statystyczne przeprowadzono na wartościach AUC, gdzie średnie dla grup wynosiły: ♂ WT NaCl $1844 \pm 84,71$; ♂ KO NaCl $1836 \pm 79,10$; ♂ WT LPS $1956 \pm 117,2$; ♂ KO LPS $1468 \pm 79,55$; ♀ WT NaCl $1856 \pm 69,13$; ♀ KO NaCl $1718 \pm 91,61$; ♀ WT LPS $1629 \pm 86,55$; ♀ KO LPS $1432 \pm 47,74$. Trójczynnikiowa ANOVA wykryła istotny wpływ czynników genotypu ($F_{1,93} = 12,22$; $p < 0,001$), substancji ($F_{1,93} = 10,44$; $p < 0,01$) oraz interakcji między nimi ($F_{1,93} = 5,15$; $p < 0,05$). Płeć ($F_{1,93} = 3,89$; $p > 0,05$) oraz efekty interakcji czynnika płci z innymi zmiennymi nie przekroczyły progu istotności (płeć x genotyp: $F_{1,93} = 0,46$; $p > 0,05$; płeć x substancja: $F_{1,93} = 1,16$; $p > 0,05$; płeć x genotyp x substancja: $F_{1,93} = 3,159$; $p > 0,05$). Analiza post-hoc między grupami wykazała istotne różnice wyłącznie w grupie samców. Samce KO LPS były mniej aktywne od nokautów traktowanych NaCl ($t = 2,336$; $p < 0,05$). Oprócz tego, wykryto różnice między samcami różniącymi się genotypem i traktowanymi LPS, samce pozbawione aktywnego MMP-9 wykazały niższą aktywność od samców WT ($t = 4,181$; $p < 0,001$).

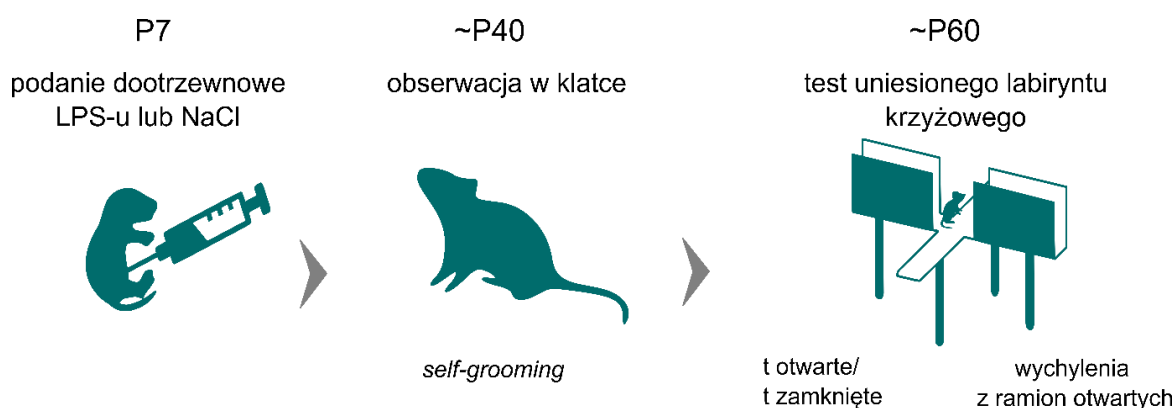
Wpływ stymulacji układu odpornościowego w siódmym dniu na aktywność zwierząt linii MMP-9 KO był wyraźniejszy niż u myszy szczepu B6. Obniżoną aktywność w grupach poddanych iniekcji LPS zaobserwowano już podczas krótkiego, pięciominutowego testu EPM. Samce z grup LPS, niezależnie od genotypu, były mniej aktywne. Podobny efekt zaobserwowano u samic KO LPS w porównaniu do grupy KO NaCl. W teście eksploracji nowej klatki, w którym zwierzęta badano w grupie, również potwierdzono niższą aktywność wśród samców LPS. Natomiast w przypadku samic spadek eksploracji wystąpił tym razem u niezmienionych genetycznie myszy LPS w porównaniu do grupy samic WT NaCl. Co ciekawe, podczas sześciogodzinnej analizy eksploracji uwidoczniły się różnice między niezmienionymi genetycznie myszami a samicami KO z grup kontrolnych NaCl. Brak aktywnego białka MMP-9 prowadził do obniżonej eksploracji u samic NaCl, natomiast efekt ten nie był widoczny po podaniu LPS. U samców różnice między nokautami a niezmienionymi genetycznie osobnikami były zauważalne jedynie w teście aktywności dobowej po podaniu czynnika zapalnego. W tym przypadku samce KO LPS były mniej aktywne od samców WT LPS, ale także od nokautów z grupy kontrolnej NaCl.



Ryc. 4.22. Aktywność dobową zwierząt linii MMP-9 KO. Między 2 a 4 dniem eksperymentu zliczano liczbę wizyt pomiędzy klatkami aparatu Eco-HAB™ (w cyklu 12-godzinny, szarymi prostokątami oznaczono fazę ciemną). Samce KO LPS wykazały niższą aktywność dobową w porównaniu do grupy samców KO NaCl, a także WT LPS. Na wykresie * oznacza $p \leq 0,05$; a *** $p \leq 0,001$. Na legendzie pokazano sposób oznaczenia porównań między grupami. Liczebność grup: ♂ WT NaCl $n = 13$, ♂ KO NaCl $n = 12$, ♂ WT LPS $n = 13$, ♂ KO LPS $n = 13$, ♀ WT NaCl $n = 13$, ♀ KO NaCl $n = 11$, ♀ WT LPS $n = 13$, ♀ KO LPS $n = 13$, gdzie n = liczba zwierząt wykorzystanych w badaniu.

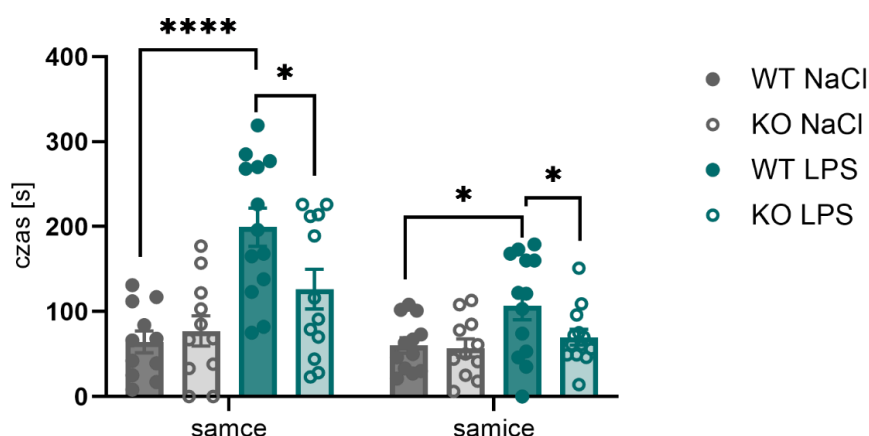
4.3.2 Emocjonalność zwierząt linii MMP-9 KO

Tak jak w przypadku kohorty zwierząt B6, myszy linii MMP-KO również poddane zostały testom oceniającym emocjonalność obejmujące obserwację zachowania w nowej klatce domowej oraz w EPM. Schemat doświadczenia wraz z wybranymi parametrami przedstawiono na rycinie 4.23.



Ryc. 4.23. Testy behawioralne mierzące emocjonalność myszy. Nad schematami testów podano wiek zwierząt podczas przeprowadzania doświadczenia. Pod schematami podano mierzone parametry.

Podczas obserwacji w klatce zliczano łączny czas spędzony na pielęgnacji futerka. Oprócz tego, tak jak w przypadku myszy B6, zwracano uwagę na pojawienie się innych wzorców zachowań repetytywnych. Zachowań takich jednak nie zanotowano. Średni czas (s) jaki kolejne grupy zwierząt spędziły na czyszczeniu futerka wynosił: ♂ WT NaCl $64,50 \pm 11,56$; ♂ KO NaCl $77,90 \pm 17,12$; ♂ WT LPS $209,8 \pm 21,52$; ♂ KO LPS $125,7 \pm 22,70$; ♀ WT NaCl $60,08 \pm 8,84$; ♀ KO NaCl $57,18 \pm 10,59$; ♀ WT LPS $113,2 \pm 16,78$; ♀ KO LPS $63,19 \pm 6,99$. Dane te przedstawiono na rycinie 4.24. Przeprowadzona analiza statystyczna Kruskala-Wallisa dla każdego z czynników ujawniła wpływ płci zwierząt ($H_1 = 6,342$; $p < 0,05$) oraz podanej substancji ($H_1 = 15,982$; $p < 0,001$) na obserwowany efekt. Nie wykryto natomiast wpływu genotypu na badane zachowanie ($H_1 = 3,214$; $p > 0,05$).

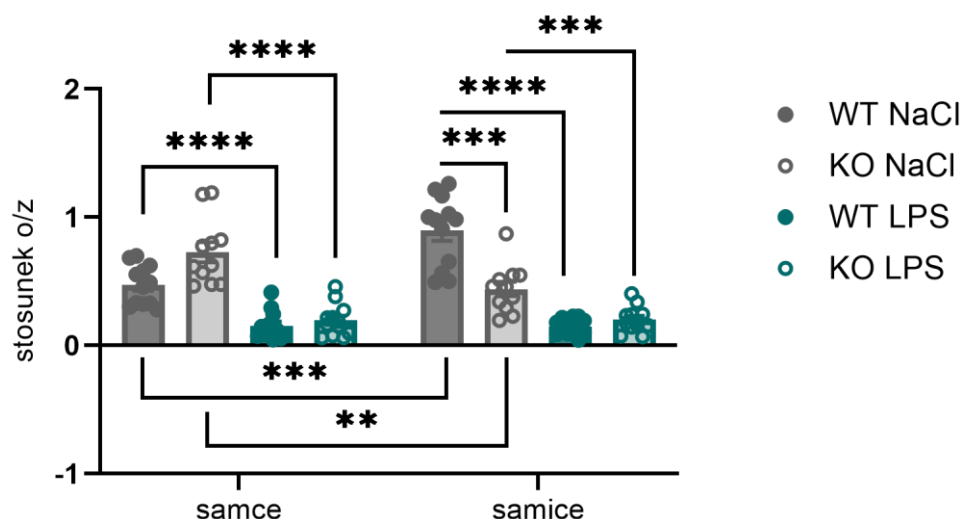


Ryc. 4.24. Czas spędzony na pielęgnacji futra myszy linii MMP-9 KO. Dane przedstawiają czas *self-groomingu* w trakcie 10-minutowej obserwacji odosobnionego zwierzęcia w klatce domowej. Samce jak i samice WT po wczesniej aktywacji układu odpornościowego spędzały więcej czasu na czyszczeniu futerka w porównaniu z odpowiadającymi im płcią grupami kontrolnymi. Dodatkowo, zarówno samce jak i samice KO poddane działaniu LPS krócej pielęgnowały futerko od odpowiadających im płcią myszy WT LPS. Na wykresie * i **** oznacza odpowiednio $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,0001$. Liczebność grup: ♂ WT NaCl $n = 12$, ♂ KO NaCl $n = 11$, ♂ WT LPS $n = 12$, ♂ KO LPS $n = 12$, ♀ WT NaCl $n = 12$, ♀ KO NaCl $n = 11$, ♀ WT LPS $n = 12$, ♀ KO LPS $n = 12$, gdzie n = liczba zwierząt użytych w badaniu.

Dzięki porównaniom między grupami odkryto, że myszy WT LPS poświęcają więcej czasu na *self-grooming*. W przypadku samców efekt ten był silniejszy ($U = 5,00$; $p < 0,0001$) niż u samic ($U = 29,50$; $p < 0,05$). U myszy KO, nie wykryto różnic pomiędzy grupami NaCl i LPS. Różnice pomiędzy genotypami były widoczne u obu płci, ale ujawniły się dopiero po podaniu LPS. Nokauty obu płci krócej czyściły futerko w porównaniu do niezmienionego genetycznie rodzeństwa (samce: $U = 32,00$; $p < 0,05$; samice: $U = 34,50$; $p < 0,05$).

Kolejnym badanym aspektem emocjonalności zwierząt był poziom lękliwości. Podczas testu EPM mierzono czas spędzony w ramionach otwartych i zamkniętych labiryntu, a stosunek między tymi dwoma wartościami stanowił o relacji między potrzebą eksploracji a lękiem przed nieznanym. Im wyższy stosunek o/z tym większa przewaga eksploracji, czyli niższa lękliwość. Lękliwość zwierząt linii MMP-9 KO wyrażoną jako stosunek o/z przedstawiono na rycinie 4.25. Średnie wartości tego parametru wynosiły: ♂ WT NaCl $0,47 \pm 0,04$; ♂ KO NaCl $0,73 \pm 0,08$; ♂ WT LPS $0,15 \pm 0,03$; ♂ KO LPS $0,19 \pm 0,04$; ♀ WT NaCl $0,90 \pm 0,08$; ♀ KO NaCl $0,44 \pm 0,06$; ♀ WT LPS $0,15 \pm 0,02$; ♀ KO LPS $0,20 \pm 0,03$. Dzięki testom Kruskala-Wallisa wykryto, że główny wpływ na obserwowany wynik miała podana substancja ($H_1 = 61,401$; $p < 0,0001$), natomiast

czynniki płci ($H_1 = 0,113$; $p > 0,05$) oraz genotypu zwierząt ($H_1 = 0,001$; $p > 0,05$) nie przekroczyły progu istotności statystycznej.



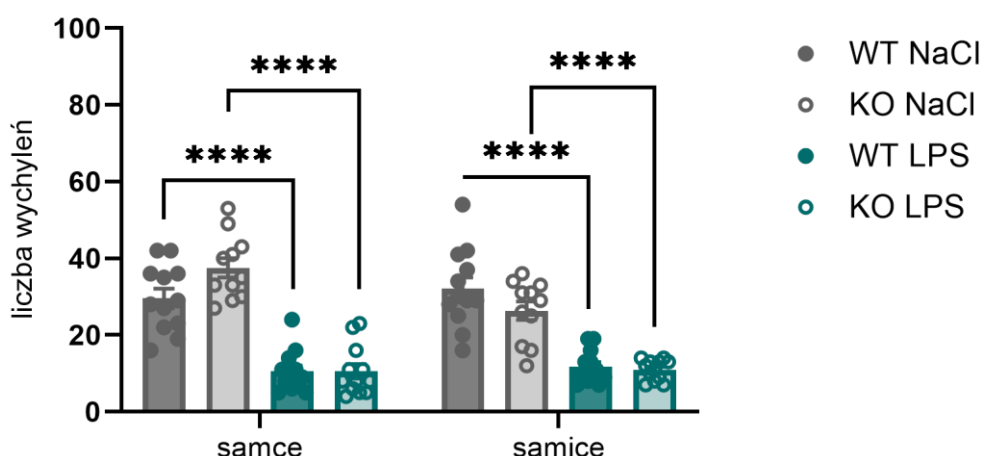
Ryc. 4.25. Łęklivość myszy linii MMP-9 KO. Stosunek czasu spędzonego w ramionach otwartych labiryntu do czasu spędzonego w ramionach zamkniętych aparatu EPM (stosunek o/z). Grupy zwierząt poddanych działaniu LPS, bez względu na płć i genotyp, wykazywały podwyższony poziom lęklivości w porównaniu do odpowiadających im kontroli NaCl. Ponadto, samice KO NaCl były bardziej lęklive od samic WT NaCl. Dodatkowo, samice WT NaCl były mniej złąknione od samców WT NaCl. Natomiast w przypadku nokautów, samice NaCl wykazały wyższą lęklivość od samców NaCl. Na wykresie **, *** i **** oznacza kolejno: $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$ oraz $p \leq 0,0001$. Liczebność grup: ♂ WT NaCl $n = 12$, ♂ KO NaCl $n = 11$, ♂ WT LPS $n = 12$, ♂ KO LPS $n = 12$, ♀ WT NaCl $n = 12$, ♀ KO NaCl $n = 11$, ♀ WT LPS $n = 12$, ♀ KO LPS $n = 12$, gdzie n = liczba zwierząt wykorzystanych w badaniu.

Testy wykonane między grupami ujawniły, że po aktywacji układu odpornościowego, bez względu na genotyp i płć, dochodziło do podwyższenia poziomu lęku w porównaniu do grup, którym podano NaCl (samce WT: $U = 6,00$; $p < 0,0001$; samce KO: $U = 0,00$; $p < 0,0001$; samice WT: $U = 0,00$; $p < 0,0001$; samice KO: $U = 14,00$; $p < 0,001$). Co istotne, ustalono również, że samice KO NaCl były bardziej lęklive od samic WT NaCl ($U = 10,00$; $p < 0,001$). Porównania pomiędzy płciami ujawniły, że stosunek o/z samic WT NaCl był wyższy w porównaniu do samców WT NaCl ($U = 16,00$; $p < 0,001$). Natomiast porównanie między nokautami NaCl obu płci wykazało, że samice były bardziej złąknione od samców ($U = 18,00$; $p < 0,01$).

Ostatnim parametrem mierzonym w teście EPM była liczba niezabezpieczonych wychyleń z ramion otwartych labiryntu. Średnia liczba wychyleń w każdej z grup wyniosła: ♂ WT NaCl $29,58 \pm 2,50$; ♂ KO NaCl $37,55 \pm 2,54$; ♂ WT LPS $10,50 \pm 1,57$;

♂ KO LPS $10,58 \pm 1,87$; ♀ WT NaCl $32,08 \pm 2,99$; ♀ KO NaCl $26,36 \pm 2,43$; ♀ WT LPS $11,75 \pm 1,24$; ♀ KO LPS $10,52 \pm 0,76$. Dane te zaprezentowano na rycinie 4.26. Wieloczynnikowa analiza wariancji wykryła główny udział czynnika „podana substancja” ($F_{1,86} = 190,5$; $p < 0,0001$), a także współdziałania czynników „płeć” i „genotyp” ($F_{1,86} = 6,065$; $p < 0,05$) oraz interakcji wszystkich trzech zmiennych (płeć x genotyp x substancja: $F_{1,86} = 4,637$; $p < 0,05$). Sam czynnik „płeć” ($F_{1,86} = 1,434$; $p > 0,05$) oraz „genotyp” ($F_{1,86} = 0,063$; $p > 0,05$), jak również interakcje między płcią a podaną substancją ($F_{1,86} = 2,999$; $p > 0,05$) oraz między genotypem a podaną substancją ($F_{1,86} = 0,255$; $p > 0,05$) nie okazały się istotne dla opisywanego efektu.

Tak jak w przypadku lęklivosti, predyspozycja do podejmowania ryzyka była obniżona u zwierząt poddanych iniekcji LPS, bez względu na płeć i genotyp (samce WT: $t = 6,511$; $p < 0,0001$; samce KO: $t = 8,997$; $p < 0,0001$; samice WT: $t = 6,938$; $p < 0,0001$; samice KO: $t = 5,155$; $p < 0,0001$).



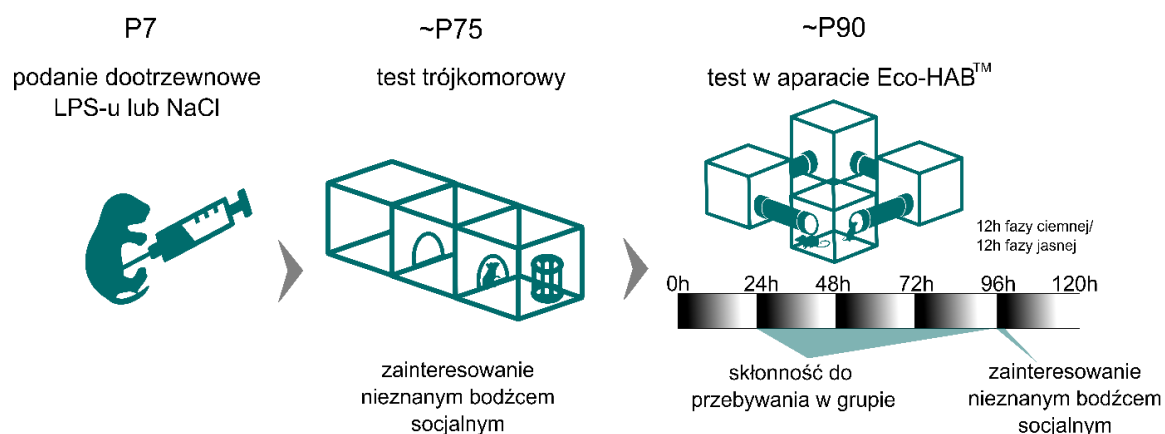
Ryc. 4.26. Predyspozycja zwierząt linii MMP-9 KO do podejmowania zachowania ryzykownego. Mierzono liczbę niezabezpieczonych wychyleń z ramion otwartych EPM. Zwierzęta obu płci traktowane LPS wykonały mniej wychyleń w porównaniu do kontroli, efekty były obserwowane bez względu na genotyp. Na wykresie **** oznacza $p \leq 0,0001$. Liczebność grup: ♂ WT NaCl $n = 12$, ♂ KO NaCl $n = 11$, ♂ WT LPS $n = 12$, ♂ KO LPS $n = 12$, ♀ WT NaCl $n = 12$, ♀ KO NaCl $n = 11$, ♀ WT LPS $n = 12$, ♀ KO LPS $n = 12$, gdzie n = liczba zwierząt wykorzystanych w badaniu.

Analiza emocjonalności zwierząt linii MMP-9 KO wykazała, że są one wrażliwe na stymulację czynnikiem zapalnym. Myszy bez względu na płeć i genotyp były bardziej lękliwe i mniej chętnie podejmowały ryzykowne zachowania po podaniu LPS. Czyszczenie futerka, które może być objawem umiarkowanego stresu ¹⁹², okazało się być wzmożone

tylko w przypadku zwierząt WT po iniekcji LPS. Co ciekawe, na kohorcie zwierząt B6 nie wykryto tak szerokiego spektrum działania LPS na emocjonalność myszy. Ponadto, jedyny wpływ zaobserwowano wśród samców B6. Po stymulacji układu odpornościowego były one mniej lękliwe. Efekt LPS na emocjonalność zwierząt może być więc zależny od badanej linii myszy.

4.3.3 Socjalność zwierząt linii MMP-9 KO

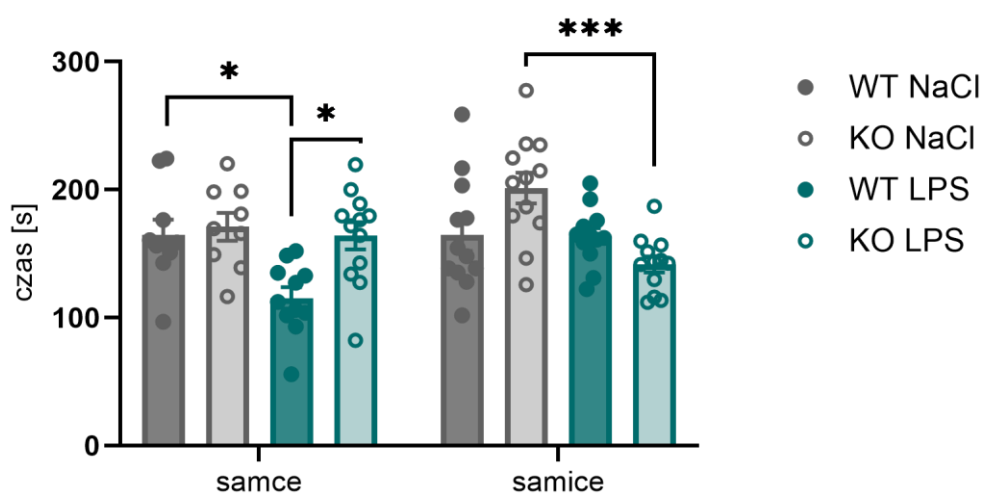
Ostatnią serię doświadczeń behawioralnych przeprowadzono w celu zbadania zachowania socjalnego. Zmierzono zainteresowanie nieznany bodźcem socjalnym pojedynczo jak i w grupie, a także preferencje do spędzania czasu w grupie znanych zwierząt. Schemat doświadczenia i wiek zwierząt w trakcie przeprowadzania testów zaprezentowano na rycinie 4.27.



Ryc. 4.27. Testy behawioralne mierzące zachowania społeczne w różnych warunkach. Nad schematami testów podano wiek zwierząt podczas przeprowadzania doświadczenia.

Ocenę zachowania społecznego myszy linii MMP-9 KO rozpoczęto od testu trójkomorowego. Jako miarę zainteresowania nieznany bodźcem społecznym zastosowano czas jaki zwierzęta spędziły na kontakcie ze ściółką pochodzącą z klatki 2-3 nieznanych osobników tej samej płci. Średni czas (s) jaki zwierzęta spędziły na kontakcie z nieznany zapachem społecznym wynosił: ♂ WT NaCl $164,8 \pm 11,77$; ♂ KO NaCl $171,0 \pm 10,90$; ♂ WT LPS $115,4 \pm 8,40$; ♂ KO LPS $164,0 \pm 10,69$; ♀ WT NaCl $164,9 \pm 12,70$; ♀ KO NaCl $201,3 \pm 12,03$; ♀ WT LPS $163,4 \pm 6,59$; ♀ KO LPS $141,7 \pm 6,27$. Dane te przedstawiono na rycinie 4.28. Testowanie statystyczne wykazało istotny udział czynnika podanej substancji ($F_{1, 82} = 16,56$; $p < 0,001$), genotypu ($F_{1, 82} = 5,803$; $p < 0,05$), a także interakcji wszystkich trzech zmiennych (płeć x genotyp x

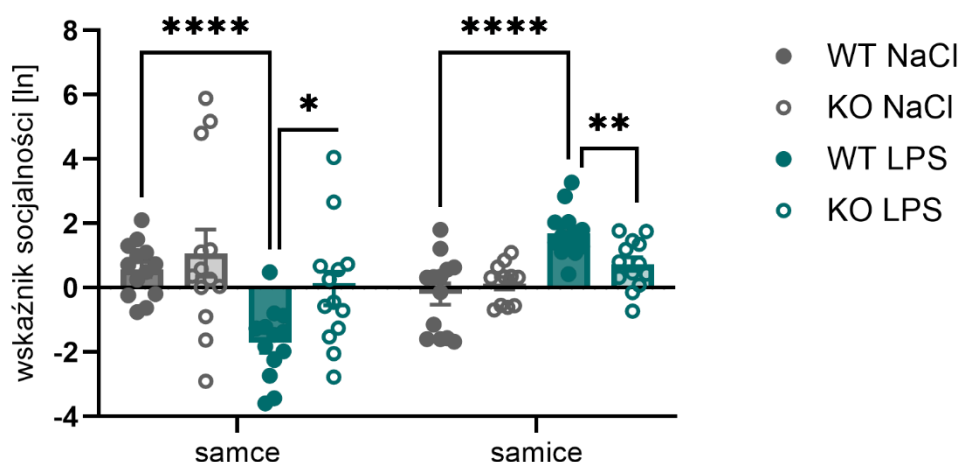
substancja: $F_{1,82} = 12,11$; $p < 0,001$). Sam czynnik płci ($F_{1,82} = 3,762$; $p > 0,05$), a także pozostałe interakcje (płeć x genotyp: $F_{1,82} = 1,922$; $p > 0,05$; płeć x substancja: $F_{1,82} = 0,027$; $p > 0,05$; genotyp x substancja: $F_{1,82} = 0,296$; $p > 0,05$) nie były istotne dla uzyskanego wyniku. Analiza *post-hoc* Šídáka wykazała, że samce WT traktowane LPS spędziły krótszy czas na kontakcie z nieznany bodźcem społecznym w porównaniu do grupy samców WT NaCl ($t = 3,319$; $p < 0,05$). Takiego efektu nie zaobserwowano u zwierząt pozbawionych aktywnego białka MMP-9. Zauważono różnice między samcami o odmiennych genotypach i traktowanymi LPS. Samce z grupy KO LPS były bardziej zainteresowane nieznany zapachem od samców WT LPS ($t = 3,418$; $p < 0,05$). Co ciekawe, w grupie samic krótszy czas spędzony na kontakcie z bodźcem socjalnym zanotowano wyłącznie u nokautów LPS, w porównaniu do nokautów NaCl ($t = 4,287$; $p < 0,001$).



Ryc. 4.28. Zainteresowanie zwierząt linii MMP-9 KO bodźcem socjalnym pochodzącym od nieznanych zwierząt podczas 10 minut testu trójkomorowego. Samce WT LPS spędziły mniej czasu na kontakcie z bodźcem socjalnym w porównaniu z grupą kontrolną. Grupa samców KO LPS była również bardziej zainteresowana bodźcem socjalnym w porównaniu do odpowiadającej jej płci grupy WT LPS. U samic KO zauważono mniejsze zainteresowanie nieznany bodźcem socjalnym po podaniu LPS w porównaniu do kontroli o tym samym genotypie. Na wykresie * oznacza $p \leq 0,05$; a *** $p \leq 0,001$. Liczebność grup: ♂ WT NaCl $n = 10$, ♂ KO NaCl $n = 9$, ♂ WT LPS $n = 11$, ♂ KO LPS $n = 12$, ♀ WT NaCl $n = 12$, ♀ KO NaCl $n = 12$, ♀ WT LPS $n = 12$, ♀ KO LPS $n = 12$, gdzie n = liczba zwierząt użytych w badaniu.

Następnie myszom linii MMP-9 zaprezentowano nieznany bodziec społeczny w zautomatyzowanym systemie Eco-HAB™. Prezentacji dokonano po 4-dniowej habituacji do aparatu, w którym zwierzęta przebywały w grupie. Korzystając z opisanego wcześniej wzoru obliczono zainteresowanie nieznany bodźcem społecznym w ciągu

pierwszej godziny, uwzględniający przy tym między innymi preferencję miejsca. Dane logarytmizowano, wartości dodatnie świadczyły o preferencji bodźca, a ujemne o awersji względem niego. Średnio wskaźnik socjalności wynosił: ♂ WT NaCl $0,569 \pm 0,24$; ♂ KO NaCl $1,077 \pm 0,74$; ♂ WT LPS $-1,715 \pm 0,31$; ♂ KO LPS $-0,27 \pm 0,52$; ♀ WT NaCl $-0,192 \pm 0,33$; ♀ KO NaCl $0,139 \pm 0,19$; ♀ WT LPS $1,691 \pm 0,21$; ♀ KO LPS $0,734 \pm 0,21$. Wykres przedstawiający te dane zaprezentowano na rycinie 4.29. Przeprowadzono analizę Kruskala-Wallisa, która wykazała, że głównym czynnikiem wpływającym na uzyskany efekt była płeć ($H_1 = 7,755$; $p < 0,01$), natomiast podana substancja ($H_1 = 0,013$; $p > 0,05$) oraz genotyp zwierząt ($H_1 = 0,201$; $p > 0,05$) nie miały bezpośredniego wpływu na wynik. Wykonując porównania między grupami odkryto, że samce WT po podaniu LPS cechują się niższym zainteresowaniem nieznany bodźcem społecznym w porównaniu z kontrolą WT NaCl ($U = 5,00$; $p < 0,0001$). Nie zaobserwowano tego efektu w grupie samców KO. Samce KO LPS miały wyższy wskaźnik socjalności w porównaniu do rodzeństwa WT traktowanego tą samą substancją ($U = 35,00$; $p < 0,05$). Samice WT LPS były bardziej zainteresowane bodźcem społecznym od nieznanych myszy w porównaniu do samic WT NaCl ($U = 13,00$; $p < 0,0001$). Tak jak w przypadku samców, pomiędzy grupami samic KO nie zaobserwowano zmian po podaniu czynnika bakteryjnego. Wykazano natomiast, że samice KO po podaniu LPS były mniej zainteresowane bodźcem społecznym w porównaniu do samic WT LPS.



Ryc. 4.29. Zainteresowanie zwierząt linii MMP-9 KO bodźcem socjalnym pochodzącym od nieznanych zwierząt podczas pierwszej godziny od prezentacji bodźców w aparacie Eco-HAB™. Samce WT traktowane LPS były mniej zainteresowane nieznanim bodźcem socjalnym w porównaniu do kontroli NaCl. Odwrotnie, samice WT z grupy LPS wykazywały wyższe zainteresowanie bodźcem socjalnym w porównaniu do odpowiadającej im kontroli NaCl. Dodatkowo, samce KO LPS miały wyższy wskaźnik socjalności w porównaniu do samców WT LPS. W grupie samic traktowanych LPS to osobniki WT LPS miały wyższy wskaźnik socjalności od grupy KO LPS. Na wykresie *, **, **** oznaczają kolejno $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ oraz $p \leq 0,0001$. Liczebność grup: ♂ WT NaCl $n = 13$, ♂ KO NaCl $n = 13$, ♂ WT LPS $n = 13$, ♂ KO LPS $n = 13$, ♀ WT NaCl $n = 13$, ♀ KO NaCl $n = 11$, ♀ WT LPS $n = 13$, ♀ KO LPS $n = 13$, gdzie n = liczba zwierząt użytych w badaniu.

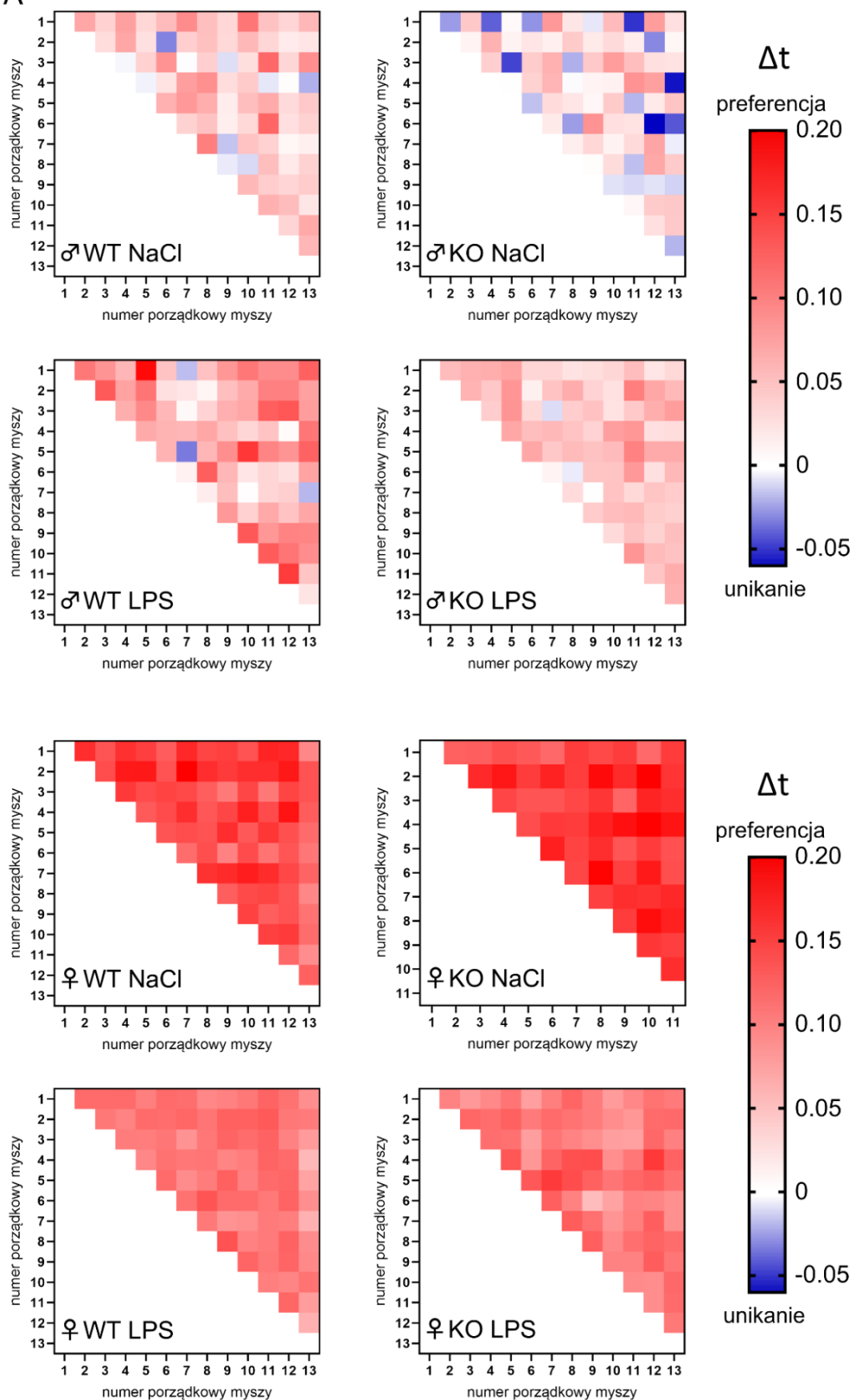
Korzystając z aparatu Eco-Hab.™, w którym myszy bytowały w grupie, zmierzono również skłonność zwierząt do przebywania wśród znanych osobników. Pomiaru czasu jaki zwierzęta spędzały razem dokonywano między 2 a 4 dniem eksperymentu, a następnie obliczano preferencję na podstawie wzoru opisanego w rozdziale Materiały i metody. Preferencję do spędzania czasu razem dla każdej pary myszy zaprezentowano na panelu A ryciny 4.30. Dodatnie wartości stanowiły o chęci spędzania czasu razem, natomiast wartości ujemnie o unikaniu się badanej pary zwierząt. Na podstawie danych uzyskanych dla każdej pary zwierząt obliczono średnią wartość socjalności w grupie dla każdego osobnika i na tej podstawie przeprowadzono testowanie statystyczne. Dane w formie wykresów przedstawiono na panelu B ryciny 4.30.

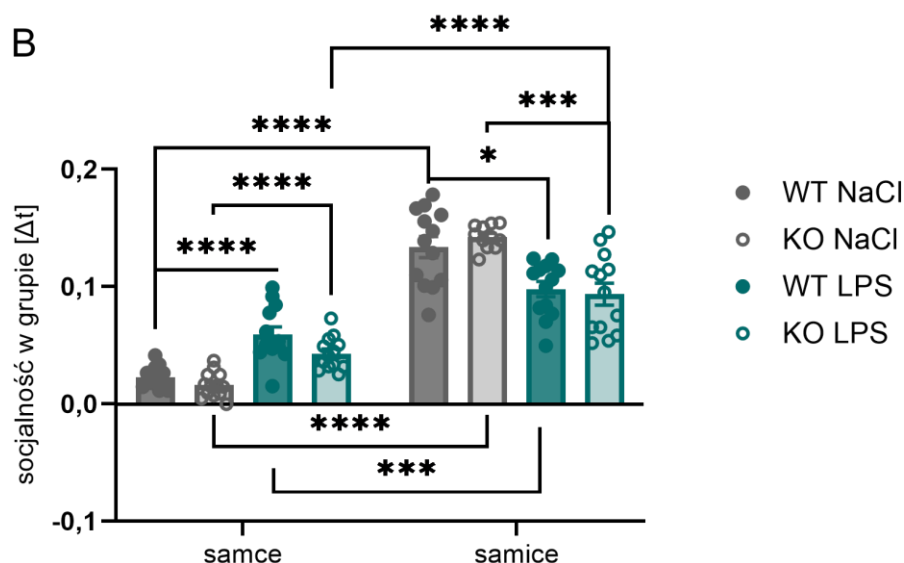
Średnie wartości parametru socjalność w grupie wynosiły: ♂ WT NaCl $0,023 \pm 0,002$; ♂ KO NaCl $0,016 \pm 0,003$; ♂ WT LPS $0,059 \pm 0,006$; ♂ KO LPS $0,043 \pm 0,004$; ♀ WT NaCl $0,134 \pm 0,009$; ♀ KO NaCl $0,142 \pm 0,003$; ♀ WT LPS $0,098 \pm 0,006$; ♀ KO LPS $0,094 \pm 0,009$. Analiza statystyczna Kruskala-Wallisa wykazała istotność czynnika płci ($H1 = 67,792$; $p < 0,0001$), ale nie bezpośredni wpływ podanej

substancji ($H1 = 0,485$; $p > 0,05$) czy genotypu zwierząt ($H1 = 0,593$; $p > 0,05$). Wielokrotne testy Manna-Whitneya wykazały, że w grupie samców, bez względu na genotyp, podanie LPS powodowało wzrost czasu, który zwierzęta spędzały wspólnie w porównaniu do kontrolnych grup NaCl (WT: $U = 10,00$; $p < 0,0001$; KO: $U = 8,00$; $p < 0,0001$). W grupie samic zauważono natomiast, że podanie czynnika bakteryjnego zarówno samicom WT, jak i samicom KO prowadzi do niższego zainteresowania spędzaniem czasu razem w porównaniu do samic NaCl (WT: $U = 39,00$; $p < 0,05$; KO: $U = 13,00$; $p < 0,001$). Dodatkowo, stwierdzono, że samice wszystkich grup chętniej spędzały czas razem w porównaniu do samców o takim samym genotypie i warunku eksperymentalnym (WT NaCl: $U = 0,00$; $p < 0,0001$; KO NaCl: $U = 0,00$; $p < 0,0001$; WT LPS: $U = 22,00$; $p < 0,001$; KO LPS: $U = 9,00$; $p < 0,0001$).

Efekt podania czynnika bakteryjnego na zachowanie społeczne myszy zdawał się być zachowany pomiędzy różnymi kohortami zwierząt linii MMP-9 KO i szczepu B6. W przypadku reakcji na nieznany bodziec społeczny samce WT po iniekcji LPS były mniej zainteresowane od kontroli NaCl. W przypadku samic WT podanie LPS prowadziło do wzrostu zainteresowania, jednak efekt ten był widoczny tylko podczas prezentacji nieznanego zapachu grupie zwierząt (Eco-HAB™). Co istotne, nokaute MMP-9 obu płci po podaniu LPS nie różniły się od zwierząt KO NaCl, taki wynik może wskazywać na rolę białka MMP-9 w powstawaniu zaburzeń społecznych w badanym modelu. Jedyne wyjątek stanowi obniżone zainteresowanie samic KO LPS względem KO NaCl podczas testu trójkomorowego, takiego wyniku nie wykazano jednak podczas dłuższego testowania w aparacie Eco-HAB™. Brak aktywnego MMP-9 nie modulował jednak skłonności do przebywania w grupie. Samce LPS bez względu na genotyp chętniej spędzały czas w grupie od samców NaCl, a samice LPS krócej przebywały razem w porównaniu do grup kontrolnych. Zdaje się więc, że wpływ MMP 9 na powstawanie zmian w zachowaniu myszy jest ograniczony do konkretnego aspektu behawioru społecznego, jakim jest reagowanie na nieznanego osobnika.

A





Ryc. 4.30. Skłonność myszy linii MMP-9 KO do przebywania w grupie mierzona pomiędzy drugim a czwartym dniem testu Eco-HAB™. A Mapy cieplne. Każdy kwadrat w macierzy reprezentuje parę zwierząt i pokazuje różnicę między całkowitym czasem spędzonym razem a czasem jaki zwierzęta spędziłyby wspólnie, gdyby niezależnie eksplorowały aparat. Intensywność koloru czerwonego jest proporcjonalna do wartości Δt . **B** Średnia wartość socjalności w grupie dla każdej z myszy. Samce po wczesnej aktywacji układu odpornościowego bez względu na genotyp spędziły ze sobą więcej czasu w porównaniu do kontroli. Natomiast samice zarówno WT jak i KO traktowane LPS spędziły mniej czasu wspólnie w trakcie trwania testu w porównaniu do kontroli NaCl. Samice bez względu na genotyp i podaną substancję przebywały chętniej w grupie od samców. Na wykresie *, ***, **** oznacza kolejno: $p \leq 0,05$, $p \leq 0,001$ oraz $p \leq 0,0001$. Liczebność grup: ♂ WT NaCl $n = 13$, ♂ KO NaCl $n = 13$, ♂ WT LPS $n = 13$, ♂ KO LPS $n = 13$, ♀ WT NaCl $n = 13$, ♀ KO NaCl $n = 11$, ♀ WT LPS $n = 13$, ♀ KO LPS $n = 13$, gdzie n = liczba zwierząt wykorzystanych w badaniu.

5. DYSKUSJA

W niniejszej rozprawie zbadano udział białka MMP-9 w powstawaniu zmian w zachowaniu w mysim modelu wczesnej stymulacji układu odpornościowego czynnikiem o pochodzeniu bakteryjnym (LPS). W wykorzystywanym modelu, w 7 dniu życia, mysim oseskom jednorazowo podawano dootrzewnowo (i.p.) bakteryjny LPS w dawce 0,05 mg/kg. Wyniki porównywano do zwierząt, którym podawano roztwór soli fizjologicznej (0,9 % roztwór NaCl).

W pierwszej kolejności dokonano oceny, czy zastosowany model stymulacji układu odpornościowego prowadzi do długotrwałych zmian w zachowaniu myszy. Badania przeprowadzono na myszach obu płci, szczepu wsobnego B6. Począwszy od 40 dnia życia zwierzęta poddawano zarówno klasycznym testom behawioralnym (obserwacja w klatce, EPM oraz test trójkomorowy) a także obserwacji w zautomatyzowanym aparacie Eco-HAB™. W toku doświadczeń przeanalizowano aktywność, emocjonalność oraz socjalność zwierząt. Wykazano, że podanie LPS w 7 dniu życia prowadzi do rozległych zmian w zachowaniu myszy w późniejszym wieku. Samce po wczesnej stymulacji układu odpornościowego charakteryzowały się: niższą aktywnością, obniżoną lęklivością, a także zaburzonym zachowaniem społecznym (słabsze zainteresowanie nieznanym bodźcem socjalnym przy wyższej preferencji do spędzania czasu w grupie). W grupie samic efekt podania LPS był nieco słabszy, ale również wiązał się z obniżeniem aktywności. Dodatkowo, obserwowane zmiany w socjalności samic były odwrotne niż u samców – samice z grupy LPS chętniej eksplorowały nieznaną zapach społeczny, lecz spędzały mniej czasu w znanej grupie w porównaniu do samic z grupy NaCl.

W drugiej części doświadczeń skupiono się na molekularnych zmianach zachodzących w organizmach siedmiodniowych zwierząt po podaniu LPS. Zbadano stężenia białek związanych z aktywacją ścieżki TLR4-MyD88-NF- κ B w surowicy zwierząt, przeanalizowano aktywność żelatynolityczną, jako miarę funkcji wybranych metaloproteaz macierzowych (MMP-2 lub MMP-9) w mózgach osesków a także sprawdzono czy podanie i.p. LPS wpływa na zmianę ekspresji genów w OUN. Wykryto, że stymulacja czynnikiem zapalnym prowadzi do wzrostu stężenia ośmiu różnych białek, w tym MMP-9. Najsilniejszą odpowiedź odpornościową we krwi zaobserwowano po 2 godzinach od podania LPS. W mózgu, 2 godz. Po iniekcji stwierdzono wyższą aktywność żelatynolityczną związaną z białkiem MMP-9 w przednich częściach kory mózgu, a u samców również w hipokampie. Natomiast analiza ekspresji genów wykazała,

że podanie LPS i.p. prowadziło do wzrostu mRNA *tnf-α*, *il-6* oraz *mmp-9* w różnych strukturach OUN, między innymi w prążkowiu.

W trzeciej części badań sprawdzono, czy białko MMP-9 jest zaangażowane w powstawanie długotrwałych zmian w zachowaniu myszy. Aby odpowiedzieć na to pytanie przeanalizowano zachowanie myszy z uszkodzonym genem MMP-9 (nokautów, KO) oraz ich niezmienionego genetycznie rodzeństwa po stymulacji LPS w siódmym dniu życia. Do oceny behawioralnej wykorzystano ten sam schemat doświadczalny jak w części pierwszej. Podanie LPS oseskom linii MMP-9 KO prowadziło do spadku aktywności, ale odwrotnie niż w przypadku zwierząt o genotypie dzikim (B6), wzrostu lękliwości. Zmiany w socjalności pod wpływem iniekcji LPS były zachowane między kohortą B6, a zwierzętami WT z linii MMP-9 KO (u samców słabsza preferencja obcego zapachu społecznego i chętniejsze spędzanie czasu w grupie, a u samic efekty odwrotne). W przypadku reakcji na nieznany bodziec społeczny nie stwierdzono jednak wpływu LPS na nokauty MMP-9 (wyniki uzyskane w aparacie Eco-HAB™).

5.1 Jednorazowe podanie LPS w siódmym dniu życia prowadzi do długotrwałych zmian w zachowaniu myszy

Na podstawie uzyskanych danych dotyczących behawioru zwierząt B6 udało się potwierdzić, że nawet jednorazowe podanie LPS w okresie wzmożonej synaptogenezy prowadzi do długotrwałych zmian w zachowaniu. Samce po podaniu LPS były mniej aktywne w znanym środowisku (ryc. 4.4.), natomiast u samic obniżona aktywność widoczna była podczas eksploracji nowej klatki w grupie (ryc. 4.3.). Wcześniejsze publikacje nie dostarczają rozstrzygających informacji na temat wpływu wczesnej stymulacji LPS na aktywność lokomotoryczną. U samic myszy, ale nie samców, traktowanych w P9 podskórną iniekcją LPS (10 mg/kg m. c.) zaobserwowano obniżoną aktywność w teście otwartego pola¹²⁵. W przypadku samców obniżoną aktywność eksploracyjną stwierdzono zarówno w teście otwartego pola, jak i w EPM, po iniekcji 0,25 mg/kg LPS w P14¹⁸⁶. Natomiast w innych pracach nie stwierdzono niższej aktywności po jednorazowej stymulacji układu odpornościowego szczurów w P3, P7, P14 ani P21^{95,193–195}. W badaniach stosujących wielokrotne podanie czynnika zapalnego, wpływ na aktywność również jest dyskusyjny. W najczęściej stosowanym modelu, polegającym na podaniu LPS w P3 i P5, wykazano obniżoną aktywność eksploracyjną u zwierząt zarówno w okresie młodzieńczym, jak i w dorosłości^{196–198}. Podanie myszom LPS w P5 i P7 dniu, a w innej pracy w P14, P16 i P18, również prowadziło do niższej

eksploracji^{124,199}. Natomiast w innych pracach stosujących wcześniej wymieniony model iniekcji LPS w P3 i P5, nie wykazano różnic w aktywności^{200,201}. Pięciokrotne podanie LPS (P0, P2, P4, P6, P8) również nie prowadziło do zmiany w aktywności²⁰². Tylko w jednym badaniu doniesiono, że aktywacja układu odpornościowego w 3 i 5 dniu prowadzi do wzrostu aktywności szczurów w trakcie testu otwartego pola²⁰³. W wymienionych pracach korzystano z klasycznych i krótkich testów behawioralnych: testu otwartego pola (ang. *open field*, OF), EPM lub testu jasnej/ciemnej komory (ang. *light/dark box*). Wszystkie te metody, poza badaniem aktywności lokomotorycznej, wykorzystywane są do pomiarów lękliwości zwierząt. Tak jak, opisany w rozdziale 3. EPM, testy te opierają się na przeciwstawieniu naturalnej potrzeby eksploracji i awersyjnych dla gryzoni warunków środowiska: oświetlonego środka aparatu (OF) czy naświetlonej komory (test jasnej/ciemnej komory). Aktywność mierzona w tych testach może zależeć od poziomu lęku; na przykład zastyganie (ang. *freezing*), oprócz sygnalizowania objawów lękliwości, wpływa również na skrócenie czasu aktywności¹¹⁷. W wielu cytowanych pracach zaobserwowano obniżenie lękliwości, co zostanie jeszcze szerzej omówione w dalszej części Dyskusji. Należy więc wziąć pod uwagę, że brak różnic w aktywności między grupami LPS i grupami kontrolnymi może być maskowany obniżoną lękliwością¹¹⁷. Dodatkowo testy te przeprowadzane są na pojedynczym zwierzęciu. W niniejszej rozprawie wpływ LPS na aktywność zwierząt B6 uwidocznił się tylko w trakcie testowania w grupie i to podczas długotrwałej obserwacji: 6 godzin eksploracji aparatu Eco-HAB™ i 3 dni analizy trybu dobowego. Możliwe rozbieżności w uzyskiwanych wynikach związanych z aktywnością mogą być więc nie tylko związane z różnymi dawkami LPS czy okresem w rozwoju stymulowanych osesków, ale także z warunkami przeprowadzania samego testu. W pracach gdzie jednorazowe podanie LPS nie wywołało wpływu na aktywność, dawki mieściły się w stosunkowo niskim zakresie (0,05 – 0,1 mg/kg m. c.)^{95,193–195}. Nie można wykluczyć, że przy długotrwałej obserwacji w grupie uzyskano by wyniki zbliżone do tych przedstawionych w niniejszej rozprawie, w których nie stwierdzono wpływu na aktywność wyłącznie na podstawie krótkiego testu EPM. Warto także dodać, że większość wspomnianych prac opierała się na szczurzych modelach aktywacji układu odpornościowego^{95,186,193–197,199,200,202,203}. Badania na myszach przeprowadzono natomiast na szczepach CD1, NMRI oraz Swiss^{124,198,201}. Pomimo, iż w cytowanych pracach korzystano ze zwierząt niemienionych genetycznie, to obserwowane rozbieżności mogą wynikać z różnic pomiędzy gatunkami i szczepami np. w podatności na stres w warunkach testów behawioralnych²⁰⁴.

W przypadku emocjonalności zwierząt B6, wpływ wczesnej stymulacji LPS zaobserwowano wyłącznie wśród samców. Podanie w 7 dniu czynnika zapalnego prowadziło do bardziej chętniej eksploracji ramion otwartych aparatu EPM (ryc. 4.7.), co może wskazywać na obniżony poziom lęku¹⁰⁹. Dłuższy czas spędzony w otwartych ramionach nie skutkował jednak wyższą liczbą wychyleń. Podobny wynik po jednorazowej iniekcji zaprezentowano w pracy Sarkar i współpracowników, podanie 0,3 mg/kg m. c. w P9 prowadziło do wydłużenia czasu spędzonego w otwartych ramionach EPM²⁰⁵. Warto natomiast dodać, że we wspomnianej pracy zarówno samce, jak i samice wykazały się obniżoną lękliwością. W innych pracach stosujących model dłuższej stymulacji, tj. podanie 0,05 mg/kg m. c. LPS w P3 i P5, prowadziło do obniżenia zachowania lękowego u zwierząt^{197,206,207}. Co ciekawe, pomimo stosowania tego samego modelu, w pracy Claypoole i współpracowników²⁰⁷ podanie LPS miało wpływ na obie płcie, natomiast w pracy Tenk i współpracowników²⁰⁶ wykazano, że tylko u samic wczesna stymulacja czynnikiem bakteryjnym prowadziła do obniżenia lękliwości. Podobny efekt uzyskano także podając LPS w P3 i P7²⁰³, a także po trzykrotnej iniekcji w P14, P16 i P18¹⁹⁹. Interesujące wyniki przedstawiono w pracy Berkiks i współpracowników¹⁸⁶, podanie 0,25 mg/kg m. c. LPS w P14 prowadziło do obniżenia lękliwości wśród samców, natomiast samice były bardziej lękliwe. We wcześniejszej pracy tego autora podanie tej samej dawki LPS, ale w P9, prowadziło do wzrostu lękliwości u samców, niestety doświadczenia wykonano tylko na jednej płci, stąd brak porównania do samic²⁰⁸. O wzroście lękliwości wyłącznie u samców donoszono w pracach wykorzystujących podanie podskórne LPS w P9 (10 mg/kg m. c.)¹²⁵, a także wielokrotne podanie i.p. 0,05 mg/kg m. c. w P3 i P5²⁰⁹ oraz w P5 i P7²¹⁰. Co warto dodać, w pracy Custodio i współpracowników poza wzrostem lękliwości wyrażonym poprzez spędzenie krótszego czasu w otwartych strefach OF, zauważono również wpływ na inne aspekty emocjonalności samców: wzrost zachowań repetytywnych (*self-grooming*) a także więcej zachowań związanych z podejmowaniem ryzyka²¹⁰. Wzrost lękliwości u obu płci zaobserwowano po stymulacji układu odpornościowego LPS w P14 zarówno niższą dawką 0,1 mg/kg m. c.¹⁸¹, jak i pięć razy wyższą dawką (0,5 mg/kg.c)²¹¹. W niektórych modelach wielokrotnego podania LPS także zaobserwowano wzrost zachowań lękowych u obu płci (podskórne podanie 1 mg/kg m. c. w P3, P4 i P5¹⁸⁰, podanie i.p. 0,05 mg/kg m. c. w P3 i P5²⁰¹, oraz iniekcja i.p. 0,5 mg/kg m. c. w P5 i P7¹²⁴). W kilku publikacjach wskazano jednak, że stymulacja układu odpornościowego czynnikiem bakteryjnym nie prowadzi do zmian w emocjonalności, w tym w lękowości zwierząt. Jednorazowe podanie i.p. 1 mg/kg m. c. w P3²¹², 0,1 mg/kg

m. c. w P7, P10, P14, P21, P28^{194,195,212–214} nie miało wpływu na emocjonalność zwierząt. Na podstawie uzyskanych w tej rozprawie wyników, a także dostępnej literatury ciężko wyciągnąć jednoznaczne wnioski na temat wpływu wczesnego stanu zapalnego na emocjonalności zwierząt. Lękliwość zdaje się być aspektem bardzo wrażliwym na różnice w protokołach stymulacji układu odpornościowego (krotność podania, wiek, dawka), ale także inne warunki eksperymentalne np. wiek zwierząt w trakcie testowania behawioralnego. W publikacji Diné i współpracowników podanie LPS w P14 w dawce 0,1 mg/kg m. c. prowadziło do wzrostu lękliwości. Efekt LPS zaobserwowano w okresie młodzieńczym, a ponowne testowanie w dorosłości nie wskazało na różnice¹⁷⁸. Wynik doświadczeń behawioralnych jest ściśle związany z wiekiem testowanych zwierząt. U myszy w okresie młodzieńczym (P21-P47), a nawet wczesnej dorosłości (P47-P60) powtarzalność uzyskanych rezultatów jest znacząco niższa w porównaniu do zwierząt dorosłych (P60 <)²¹⁵. Jest więc możliwe, że rozbieżność w wynikach uzyskanych w niniejszej rozprawie i przedstawionych pracach jest związana także z wiekiem zwierząt podczas przeprowadzania testów behawioralnych.

Najbardziej interesujące wyniki uzyskano podczas testowania zachowania socjalnego. W dwóch zastosowanych protokołach (test trójkomorowy i test w Eco-HABTM) badających reakcję na nieznany bodziec społeczny, zastosowano ściółkę pochodzącą z klatek nieznanych myszy. Zdecydowano się na użycie takiego modelu ze względu na fakt, że prezentacja w klatce Eco-HABTM trwała kilka godzin, użycie więc żywej myszy jako bodźca byłoby niemożliwe. Myszy są zwierzętami stadnymi, a zapach innego osobnika stanowi ogromne źródło informacji o środowisku, dobrostanie, hierarchii czy potencjalnych możliwościach rozrodczych²¹⁶. W naturalnym środowisku nieznane gryzonie bez względu na płeć omijają się aby uniknąć konfrontacji, natomiast sam zapach obcego osobnika jest atrakcyjny i przyciąga myszy^{217,218}. Badania laboratoryjne potwierdziły, że zapach społeczny (w tym wypadku ściółka z klatki) jest wystarczającym bodźcem do wywołania reakcji badanych zwierząt¹³². W niniejszej dysertacji zaprezentowano wyniki wskazujące, że stymulacja układu odpornościowego na zachowania społeczne myszy ma odmienny wpływ na samce i samice (ryc. 4.10. oraz ryc. 4.11). Samce LPS były mniej zainteresowane bodźcem społecznym, zarówno podczas krótkiej prezentacji w pojedynkę (test trójkomorowy), a także dłuższej ekspozycji na zapach społeczny eksplorowany w grupie (Eco-HABTM). Wpływ LPS na zachowanie samic był uwidocznił dopiero podczas prezentacji w aparacie Eco-HABTM, gdzie samice LPS chętniej spędzały czas w klatce z nieznanym zapachem społecznym.

We wcześniejszych pracach zaprezentowano dane wskazujące, że samce poddane wczesnej aktywacji są mniej zainteresowane nieznanym osobnikiem. Takie wyniki uzyskano zarówno przy jednorazowym podaniu LPS i.p.: 1 mg/kg m. c. w P3²¹² oraz w P5²¹⁹; 0,1 mg/kg m. c. w P14²¹³; a także przy podaniach wielorazowych: 0,05 mg/kg m. c. w P3 oraz P5^{197,200,220}. Podobne wyniki zaprezentowano także przy podaniu podskórnym 10 mg/kg m. c. w P9¹²⁵ oraz przy wywołaniu stanu zapalnego poprzez bezpośrednie podanie LPS do hipokampa w P7²²¹. W dostępnych pracach, wpływ wczesnej aktywacji układu odpornościowego na socjalność zwierząt badano głównie przy użyciu testu trójkomorowego. Tak jak w przypadku opisanych w tej rozprawie wyników pochodzących z tego testu (ryc. 4.10), nie udało się wykazać wpływu podania LPS na zachowanie społeczne dorosłych samic^{125,219,220}. Jedynie w pracy Cuskelly i współpracowników, gdzie wykorzystywano bezpośrednią interakcję z nieznanym osobnikiem w klatce domowej stwierdzono, że podanie LPS w dawce 0,05 mg/kg m. c. prowadziło do wydłużenia długości czasu jaki samice spędziły na podążaniu za obcym zwierzęciem²⁰⁰. Wyniki te mogą więc stanowić potwierdzenie danych zaprezentowanych w niniejszej rozprawie, gdzie pokazano, że wpływ LPS na zachowanie społeczne samic względem nieznanego osobnika jest uwidoczniony dopiero podczas testowania w znanym sobie środowisku. W kilku pracach nie wykazano jednak wpływu wczesnej aktywacji układu odpornościowego na socjalność którejkolwiek z płci^{23,210,222}. Z drugiej strony w publikacji Smith i współpracowników⁷³ pokazano, że podanie podskórne 330 µg/kg m. c. LPS w P4 nie wpływa na zachowanie społeczne samców, ale prowadzi do spadku zainteresowania nieznanym bodźcem wśród samic. Warto jednak dodać, że przedstawione wyniki uzyskano w ramach doświadczeń na myszach transgenicznym *Myd88-floxed*, czyli zwierzętach, u których sam przebieg reakcji zapalnej jest zmodyfikowany z powodu braku możliwości propagacji sygnału na ścieżce TLR4-MyD88-NFκB⁷³. Podobnie niższe zainteresowanie nieznanym osobnikiem wśród samic, a brak reakcji samców po podaniu 0,5 mg/kg m. c. i.p. w P5 i P7 zaprezentowano w pracy Cristiano i współpracowników¹²⁴. W opisanym badaniu test trójkomorowy przeprowadzono jednak na bardzo młodych zwierzętach (P25), więc wynik ten nie stoi bezpośrednio w sprzeczności z wynikami przedstawionymi w niniejszej rozprawie. W omawianej rozprawie pokazano także, że samce LPS chętniej spędzają czas w znanej sobie grupie, a samice mniej preferują swoje towarzystwo w porównaniu do kontroli (ryc. 4.12). W pracach opisujących wpływ stymulacji czynnikiem bakteryjnym w okresie neonatalnym na zachowanie zwierząt brak jest danych na temat zmian w socjalności w znanej grupie zwierząt. W innych zwierzęcych

modelach ASD zaobserwowano jednak zaburzenia w tym aspekcie zachowania. Podanie kwasu walproinowego ciężarnym samicom, prowadziło do spadku czasu jaki męskie potomstwo spędzało razem¹³⁴. Również model genetyczny ASD, myszy nokaut genu *fmr1* (ang. *fragile X messenger ribonucleoprotein 1*) charakteryzuje się obniżoną socjalnością w grupie w porównaniu do niezmienionego genetycznie rodzeństwa¹¹². W opisanych pracach obniżenie socjalności w grupie dotyczyło samców, brak jednak danych na temat zachowania samic. W niniejszej rozprawie przedstawiono, że to właśnie samice po ingerencji postnatalnej charakteryzują się obniżeniem skłonności do przebywania w grupie. Niewielka ilość danych literaturowych stanowi więc o konieczności dalszych badań na temat zachowania społecznego myszy i wpływu różnych czynników na zmiany w dynamice stada, szczególnie z rozróżnieniem na płeć.

Wyniki dotyczące zachowania myszy B6 zaprezentowane w tej rozprawie dostarczają dowodów na to, że stymulacja jednorazową, niską dawką LPS w P7 może stanowić dobry model zaburzeń neurorozwojowych. W przywołanych wcześniej publikacjach, jak i w niniejszej dysertacji, wpływ LPS na zachowanie zwierząt różnił się ze względu na płeć. Warto również dodać, że różnice między samcami a samicami zauważono także wśród zwierząt z grup kontrolnych. W przypadku aktywności dobowej samce NaCl były bardziej aktywne od samic. Reakcja na nieznany bodziec społeczny również różniła się między płciami grup kontrolnych. Samice NaCl były mniej zainteresowane, a w przypadku dłuższej ekspozycji na bodziec (Eco-HABTM), wręcz unikały kontaktu w porównaniu do samców NaCl. Fizjologiczne różnice w zachowaniu samic i samców nie są wynikiem zaskakującym i stanowią kolejny dowód na konieczność prowadzenia badań na zwierzętach obu płci^{223,224}. Skupiając się jednak na wpływie LPS na zachowanie, zdaje się, że w przypadku samców zmiany te były rozleglejsze, ponieważ dotyczyły wszystkich aspektów (aktywności, emocjonalności i socjalności). Były również wyraźniejsze, gdyż manifestowały się zarówno w przypadku krótkich testów, np. obniżone zainteresowanie bodźcem społecznym w teście trójkomorowym, oraz podczas długotrwałej obserwacji behawioralnej. W cytowanych pracach wielokrotnie wskazywano na brak wpływu podania LPS w różnych okresach postnatalnych na zachowanie samic, być może jest to spowodowane wykorzystaniem wyłącznie klasycznych testów behawioralnych, które optymalizowano głównie na samcach. Warto zauważyć, że gdyby nie testowanie w klatce Eco-HABTM, gdzie zwierzęta przebywały w grupie i obserwowano je przez kilka dni, również nie zanotowano by różnic w zachowaniu samic B6 traktowanych LPS. Być może taki stan rzeczy związany jest z tym, że wśród samic zmiany behawioralne

są dyskretniejsze i uwidaczniają się przy dłuższej obserwacji, w bardziej naturalistycznym środowisku zautomatyzowanych klatek. Dane dotyczące stawiania diagnoz zaburzeń neurorozwojowych zdają się potwierdzać, że wśród żeńskiej populacji proces ten zajmuje dłuższy czas. Na przykład wśród szwedzkiej populacji średni wiek diagnozowania ADHD u dziewcząt wynosił 23,5 lat natomiast u chłopców 19,6²²⁵.

5.2 Stan zapalny u mysich osesków ma różny przebieg ze względu na płeć

Aby lepiej zrozumieć badany model wczesnej stymulacji układu odpornościowego, postanowiono przeanalizować przebieg stanu zapalnego u siedmiodniowych myszy. Przy użyciu zestawu Luminex® wykryto 7 białek, których poziom wzrósł w surowicy po podaniu LPS (ryc. 4.14.). Najwcześniej, bo pół godziny po iniekcji, zaobserwowano wzrost MMP-9, dodatkowo w surowicy samców zauważono wzrost CCL5. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, najmocniejszą reakcję zaobserwowano po 2 godzinach od podania²²⁶. W surowicy samców MMP-9, TIMP-1, CCL5, TNF- α , IL-6, IL-10 oraz IFN- γ były podwyższone w tym punkcie czasowym. U samic reakcja była nieco słabsza, ponieważ podwyższone stężenie stwierdzono w przypadku CCL5, TNF- α , IL-6 oraz IL-10. W ciągu kolejnych godzin (punkt czasowy 6 godzin) poziom MMP-9 był podwyższony u obu płci. Dodatkowo w surowicy samic wzrosło stężenie TIMP-1. Dobę po podaniu LPS poziom TIMP-1 był wyższy u obu płci, a oprócz tego w surowicy samic wzrosło stężenie CCL5. Tylko w jednej pracy opisano przebieg stanu zapalnego we krwi u tak młodych zwierząt, korzystając z kilku punktów czasowych. W pracy Zhang i współpracowników²²⁷ szczurzym oseskom podawano LPS i.p., w dawce 1 mg/kg m. c. w P3. Poziomy TNF- α , IL-6 oraz IL-1 β mierzono 2, 4, 6 oraz 24 godziny po iniekcji. W trzech pierwszych punktach stężenie badanych białek było podwyższone, przy czym największe różnice dla TNF- α oraz IL-1 β zaobserwowano po 2 godz., a stężenie IL-6 osiągnęło maksymalny wzrost po 6 godzinach. Niestety we wspomnianej pracy, prawdopodobnie ze względu na wiek zwierząt nie dokonywano podziału na płeć. W innych pracach opisujących stymulację układu odpornościowego w okresie neonatalnym, do sprawdzenia stanu zapalnego wykorzystywano stężenia TNF- α , IL-6 oraz IL-1 β . Podwyższone poziomy tych białek stwierdzono we krwi 90 minut po podaniu 1 mg/kg m. c. 14-dniowym szczurom²²⁸, a także dobowo po podaniu 2 mg/kg m. c. LPS w P5²²⁹. W pracy Diné i współpracowników¹⁷⁸ podanie 0,01 mg/kg m. c. LPS 14-dniowym samcom doprowadziło po 3 godz. do wzrostu TNF- α , IL-6, IL-1 β oraz IL-10. Wyższy poziom IL-6 zaobserwowano także u obu płci, 5 godz. po ostatniej iniekcji, w protokole dwukrotnego podania 0,05 mg/kg m. c. LPS

w P3 i P5²⁰⁰. W większości cytowanych w tym podrozdziale prac, autorzy donoszą o podwyższonym poziomie IL-1 β . W pracy Claypoole i współpracowników²⁰⁷ podwyższony poziom tego białka 2h po ostatniej iniekcji (stymulacji 0,05 mg/kg m. c. LPS w P3 oraz P5) stanowił jedyną miarę stanu zapalnego we krwi. W doświadczeniach przedstawionych w niniejszej rozprawie nie wykryto IL-1 β , ale także IL-4, IL-10, IL-17, IL-2 czy IL-12 p70, które często towarzyszą stanom zapalnym po aktywacji ścieżki TLR4-Myd88-NF- κ B⁶⁰. Może być to związane ze stosunkowo niewielką dawką i wyłącznie jednorazowym podaniem LPS. W pracach w których pokazano udział IL-1 β stosowano 20-, a nawet 40-krotnie większe stężenie LPS^{219,227–229}. Niewykrycie pozostałych cytokin może wynikać z faktu, że układ odpornościowy w tym okresie jest w fazie intensywnego rozwoju i odpowiedź zapalna różni się od tej obserwowanej u dorosłych zwierząt^{230–233}. Na przykład u noworodków i ośesek komórki prezentujące antygen produkują mniej IL-12p70²³⁴, a komórki NK mają obniżoną zdolność degranulacji, co wiąże się z obniżonym uwalnianiem IL-15, IL-12 czy IFN- γ ²³⁵. Badania krwi pępowinowej ujawniły także, że limfocyty T noworodków charakteryzują się niższą ekspresją genów związanych z IFN- γ , TNF- α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-13²³⁶.

W niniejszej rozprawie, 2 godz. po podaniu LPS w przednich częściach kory mózgu zaobserwowano podwyższoną aktywność żelatynolityczną na wysokości pro-MMP-9 (ryc. 4.15.), dodatkowo u samców podwyższoną aktywność enzymatyczną związaną z tym białkiem zaobserwowano w hipokampie (ryc. 4.16.). Badania nad rolą MMP-9 w modelach urazu mózgu, padaczki czy choroby Alzheimera, pokazują, że synteza pro-MMP-9 i aktywacja enzymu są regulowane niezależnie^{149,237,238}. Ze względu na to, że lizaty białkowe pozyskiwano z całych struktur mózgu, nieznane jest źródło komórkowe MMP-9 w tym modelu. Możliwe są bowiem dwa scenariusze: 1) wysoki poziom aktywności żelatynolitycznej może być związany z napływem białka z krwi przez przepuszczalną BBB; 2) sygnały komórkowe np. IL-6 aktywowały neurony i glej do uwolnienia pro-MMP-9. Z tego powodu postanowiono sprawdzić, czy w badanym modelu ekspresja genu *mmp-9* ulega zmianie. Korzystając z RT-qPCR wykazano, że 6 godz. po iniekcji LPS ekspresja *mmp-9* była względnie wyższa w korze mózgu oraz w prążkowie samców, a w mózgu samic w prążkowie, podwzgórzu, wzgórzu i hipokampie (ryc. 4.18.). W grupie samców LPS podwyższony poziom mRNA *tnf- α* zaobserwowano we wszystkich badanych regionach mózgu. U samic natomiast wzrost ekspresji mRNA tej cytokiny stwierdzono w korze mózgowej, prążkowie, podwzgórzu oraz hipokampie. Z kolei ekspresja mRNA *il-6* wzrosła 6 godz. po podaniu LPS zarówno u samców, jak i samic w prążkowie,

podwzgórz i wzgórz. U samic dodatkowo zaobserwowano zwiększoną ekspresję *il-6* w korze mózgowej oraz hipokampie. Podanie LPS w P15, P18 oraz P21 prowadziło do wzrostu ekspresji mRNA *mmp-9* w brzusznej części formacji hipokampa 2 godziny po ostatniej iniekcji¹⁷³. Dodatkowo w przednich częściach kory mózgu oraz grzbietowej części hipokampa stwierdzono wyższą ekspresję mRNA *timp-1*¹⁷³. W hipokampie 3-dniowych zwierząt traktowanych i.p. 1 mg/kg m. c. 6 godz. Po podaniu zaobserwowano podwyższoną ekspresję genów *tnf-α*, *il-6*, a także *il-1β*²²⁷. Podwyższona ekspresja genu *il-1β* utrzymywała się do dwóch tygodni od iniekcji²²⁷. Zmienioną ekspresję genów zbadano także w mózgu samców P14, 3 godz. po podaniu 0,1 mg/kg m. c.¹⁷⁸ Podwyższone poziomy mRNA *il-6*, *tnf-α*, *il-1β* oraz *il-10* stwierdzono w podwzgórz oraz w hipokampie, natomiast w przednich częściach kory oraz w ciele migdałowatym stwierdzono wzrost mRNA *il-6*, *tnf-α* oraz *il-1β*¹⁷⁸. W pracy Smith i współpracowników⁷³ dokonano pomiaru ekspresji genów w mikrogleju wyizolowanym z hipokampa 4-dniowych osesków, 2 godziny po podaniu LPS w dawce 0,33 μg/kg m. c. zaobserwowano wzrost mRNA *ifn-γ*, *il-1β*, *tnf-α*, *ccl5* oraz *cxcl10*. Na podstawie przedstawionych w niniejszej rozprawie danych dotyczących ekspresji genu *tnf-α* w mózgu samców można stwierdzić, że obwodowy stan zapalny wpłynął na ekspresję genów w całym OUN. W mózgu samic zmienioną ekspresję genów zauważono w prawie wszystkich strukturach z wyjątkiem mózdzku. Należy jednak zauważyć, że poziomy mRNA wybranych genów badano tylko w jednym punkcie czasowym po podaniu LPS. Niezmieniona ekspresja w mózdzku samic może być więc związana z inną dynamiką przebiegu stanu zapalnego u samic i samców. Obserwowane wyniki mogą też wynikać z fizjologicznych różnic w rozwoju obu płci. W pracy Hedley i współpracowników²³⁹, stwierdzono różnice w bazowych poziomach ekspresji genu *il-6*, a także *il-1β*, *il-10*, *ifn-γ* oraz *bdnf* u 7-dniowych szczurów, gdzie samce wykazywały się wyższą ekspresją tych genów w rdzeniu przedłużonym, części tyłomózgowia do którego należy także mózdzek^{240,241}. W przebiegu stanu zapalnego we krwi stwierdzono podwyższone stężenie IL-6. Od wielu lat ta cytokina znana jest z właściwości przekraczania BBB^{29,242,243}. Prawdopodobne jest, że to zaję udziałem możliwa była obserwowana odpowiedź odpornościowa w OUN osesków.

Różnice w układzie odpornościowym pomiędzy samcami i samicami opisano szczegółowo w pierwszym rozdziale dysertacji. Jednym z wymienianych czynników wpływających na te różnice są estrogeny oraz androgeny⁶⁷. Pomimo, że gonady nie pełnią w okresie neonatalnym funkcji rozrodczych, poziomy hormonów płciowych są wykrywalne już na tym etapie^{244,245}. Testosteron u samców jest wykrywalny w P0 i jego

stężenie stanowi około 50% poziomu obecnego u dorosłych zwierząt, następnie spada i utrzymuje się na niskim poziomie aż do okresu dojrzewania (P30)^{246,247}. Poziom estrogenów jest niski w pierwszym tygodniu życia, natomiast ok. P7 jajniki zaczynają produkować estradiol^{248,249}. Różnice w przebiegu stanu zapalnego u młodych zwierząt przedstawiono w pracy Kosyreva i współpracowników²⁵⁰, gdzie modelowano przebieg wczesnodziecięcej sepsy poprzez podanie 10-dniowym szczurom LPS do płuc. Pomimo, że autorzy nie wykryli różnic pomiędzy samcami i samicami w bazowych poziomach hormonów, to po podaniu LPS zaobserwowano wzrost estradiolu i testosteronu u samców²⁵⁰. Na podstawie przedstawionych w rozprawie wyników i danych literaturowych można stwierdzić, że przebieg stanu zapalnego nawet na tak wczesnym etapie rozwoju może się różnić ze względu na płeć, a w konsekwencji prowadzić do odmiennych efektów behawioralnych.

5.3 Wpływ wczesnego podania LPS na długotrwale zmiany w zachowaniu jest zależny od linii zwierząt

W literaturze można znaleźć szereg dowodów na różnice w zachowaniu zwierząt między liniami genetycznymi^{204,251}. Chociaż linia MMP-9 KO jest utrzymywana na tym samym tle genetycznym, co szczep wsobny B6 (C57BL/6J), w niniejszej pracy zaobserwowano różnice między zwierzętami B6 oraz WT pochodzącymi z linii MMP-9 KO po podaniu LPS. Zwierzęta linii MMP-9 KO były mniej aktywne, natomiast efekt ten był obserwowany w szerszym zakresie niż w przypadku zwierząt B6. Spadek aktywności zaobserwowano już podczas 5-minutowego testu EPM, gdzie zarówno samce WT i KO oraz samice KO z grup traktowanych LPS były mniej aktywne w porównaniu do odpowiadających im kontroli NaCl (ryc. 4.20). Analiza dłuższej eksploracji nowego środowiska również wykazała spadek aktywności wśród samców WT i KO poddanych wczesnej aktywacji układu odpornościowego. W grupie samic obniżoną aktywność zaobserwowano w grupie WT LPS. Co istotne u samic wykryto również różnice w aktywności ze względu na genotyp, samice KO NaCl były mniej aktywne od samic WT NaCl. W przypadku aktywności dobowej, wśród zwierząt linii MMP-9 obniżenie aktywności zanotowano wyłącznie w przypadku samców KO, po podaniu LPS były one mniej aktywne. W przypadku zwierząt B6, obniżoną aktywność u samców LPS stwierdzono tylko podczas analizy trybu dobowego, a u samic LPS podczas okresu eksploracji.

Jak wspomniano wcześniej, aktywność, szczególnie w nieznanym środowisku, może wynikać zarówno z lęku, jak i potrzeby eksploracji, co stanowi podstawę działania między innymi testu EPM^{109,117}. Analiza emocjonalności wykazała, że LPS inaczej wpływa na zwierzęta linii MMP-9 KO i szczepu B6. Myszy linii MMP-9 KO, bez względu na genotyp czy płeć, po podaniu LPS były bardziej lękliwe oraz wykonywały mniej ryzykownych wychyleń w trakcie testu EPM (ryc.4.25. i 4.26.). Dodatkowo, zwierzęta WT traktowane LPS spędziły więcej czasu na czyszczeniu futerka, co może świadczyć o wyższym poziomie lęku, ale również wskazywać na występowanie zachowań repetytywnych¹⁹². U zwierząt B6 wpływ LPS na emocjonalność zaobserwowano tylko u samców, które były mniej lękliwe w porównaniu do samców NaCl. W podrozdziale 5.2. przedstawiono już szereg dowodów za tym, że emocjonalność jest aspektem zachowania bardzo wrażliwym na stymulację układu odpornościowego na wczesnym etapie życia. Tak jak w niniejszej rozprawie, w pracy Lucchina i współpracowników²⁵² wpływ podania LPS na emocjonalność zwierząt różnił się w ramach tego samego modelu. Po stymulacji LPS w P3 zwierząt szczepów wsobnych C57BL/6J oraz BALB/c wykazano, że wyższy poziom lękliwości zaobserwowano u samic C57, a u samców tego samego szczepu pojawiło się więcej zachowań charakterystycznych dla zwierzęcych modeli depresji²⁵². Zwierzęta szczepu BALB/c wykazały się wyższą odpornością na stan zapalny w okresie neonatalnym²⁵². Autorzy oprócz zbadania zachowania myszy poddanych iniekcji LPS, scharakteryzowali także zachowanie matek względem potomstwa. Matki linii B6 spędzały więcej czasu na czyszczeniu osesków od matek linii BALB/c zarówno przed podaniem LPS (dni P1-P3), jak i po stymulacji (P3-P7)²⁵².

Zmiany w matczynej opiece lub jej brak (w modelach matczynej separacji) mają wpływ na powstawanie zaburzeń związanych z lękiem, między innymi poprzez wpływ na oś HPA^{253–255}. Kortykosteron (CT) jest hormonem steroidowym, którego poziom kontrolowany jest poprzez ujemne sprzężenie zwrotne tej osi. Jak wspomniano we wstępie, oś HPA jest aktywowana w odpowiedzi na bodźce stresowe⁷⁴. W reakcji fizjologicznej, wysoki poziom kortykosteronu hamuje produkcję i uwalnianie hormonu adrenokorykotropowego (ACTH) z jądra przykomorowego podwzgórza oraz kortykoliberyny produkowanej przez przysadkę⁷⁴. Co istotne oś HPA może być też aktywowana w reakcji na stan zapalny²⁵⁵. W części prac badających wpływ wczesnej stymulacji układu odpornościowego czynnikiem bakteryjnym na rozwój zwierząt, poza wzrostem typowych cytokin charakterystycznych dla ścieżki sygnałowej TLR4-MyD88-NF-κB, zaobserwowano także wyższe stężenie CT^{209,226,252,256}. We krwi

poziom CT był podwyższony w podobnych punktach czasowych do cytokin (od 90 min do 4 godzin). W pracy Zhong i współpracowników¹⁸⁰ stwierdzono, że wyższy poziom CT oraz ACTH utrzymuje się nawet u dorosłych zwierząt poddanych stymulacji LPS pomiędzy 3 a 5 dniem życia. Co więcej, zwierzęta linii MMP-9 KO otrzymywano poprzez kojarzenie dwóch osobników heterozygotycznych. Podczas analizy behawioralnej wykazano, że samice KO NaCl były mniej aktywne oraz bardziej lękliwe od samic WT NaCl. Poparcie tezy, że myszy o obniżonym poziomie MMP-9 są bardziej lękliwe można znaleźć w pracy Vafadari i współpracowników²⁵⁷. W tej pracy wykorzystywano myszy tej samej linii, co w niniejszej rozprawie. Wykazano tam, że zwierzęta heterozygotyczne bardziej reagowały na stres w porównaniu do zwierząt WT²⁵⁷. Możliwe więc, że wpływ LPS na aktywność i emocjonalność, różniący się między szczepem B6 a linią MMP-9 związany jest z inną opieką jaką zwierzęta otrzymywały w okresie neonatalnym od matek o innym poziomie lękliwości, szczególnie po podaniu LPS. Takie różnice mogły prowadzić do zmian w funkcjonowaniu osi HPA i odpowiedzi na stres.

Analiza skłonności do spędzania czasu w grupie przez zwierzęta po podaniu LPS dała ten sam rezultat, co w przypadku zwierząt B6. Wczesna stymulacja układu odpornościowego samców spowodowała chętniejsze przebywanie w grupie, natomiast samice LPS były mniej socjalne od samic NaCl. Efekty te były obserwowane zarówno u zwierząt WT, jak i KO. Warto dodać, że samice bez względu na traktowanie i genotyp spędzały więcej czasu razem w porównaniu do samców wszystkich grup. Różnic między samcami a samicami nie zauważono natomiast w przypadku kohorty B6. Samce i samice stosują inne strategie w procesach tworzenia hierarchii społecznych²⁵⁸. Możliwe jest więc, że różnice te zostały uwypuklone u zwierząt linii MMP-9 KO w związku z inną matczyną opieką.

5.4 MMP-9 reguluje zmiany w zachowaniu społecznym po wczesnej stymulacji układu odpornościowego

Wiele prac podkreśla rolę MMP-9 w przebiegu schorzeń wiążących się ze stanem zapalnym, takich jak ASD, schizofrenia czy udar niedokrwieny^{140,141,166}. Jednak ze względu na szeroki wachlarz działania MMP-9 oraz skomplikowany obraz tych schorzeń dokładne mechanizmy nie są jeszcze poznane. W opisanych w tej rozprawie badaniach molekularnych wykazano wzrost poziomu białka MMP-9 we krwi, zwiększoną ekspresję jego genu oraz nasiloną aktywność żelatynolityczną w mózgu po podaniu LPS siedmiodniowym oseskom. Sprawdzone także, czy MMP-9 moduluje powstawanie zmian

w zachowaniu, które obserwowano u zwierząt kohorty B6. Badania behawioralne na linii MMP-9 KO ujawniły, że białko to jest niezbędne do zmian w socjalności względem nieznanego zapachu społecznego po ekspozycji na LPS. U zwierząt KO podanie LPS nie zmieniło reakcji na nieznany bodziec społeczny, tak jak miało to miejsce w przypadku zwierząt WT oraz kohorty B6. (ryc. 4.28 oraz 4.29). W przypadku samców WT stymulacja LPS doprowadziła do spadku zainteresowania zarówno podczas krótkiej prezentacji bodźca (test trójkomorowy), jak i długotrwałej ekspozycji na nieznany zapach (Eco-HAB™). W grupie samic krótkotrwała ekspozycja na nieznany zapach socjalny nie wpłynęła na zwierzęta WT, tak jak miało to miejsce w przypadku kohorty B6. Wpływ aktywacji układu odpornościowego na samice WT zaobserwowano jednak podczas testu w aparacie Eco-HAB™, gdzie tak jak u samic B6 traktowanych LPS stwierdzono wzrost zainteresowania. Należy podkreślić, że w przypadku samic KO, krótka prezentacja w teście trójkomorowym wykazała spadek preferencji względem zapachu społecznego po podaniu LPS, ale efektu tego nie zaobserwowano już podczas dłuższej ekspozycji na zapach. Potencjalne wytłumaczenie tego zjawiska przedstawiono w pracy Winiarskiego i współpracowników¹³⁶, gdzie zaprezentowano wyniki zainteresowania nieznany zapachem społecznym w ciągu pierwszej godziny, 4 godzin oraz 11 godzin. Wykazano tam, że w zależności od linii zwierząt, reakcja na bodziec może się zmieniać wraz z długością prezentacji. Kohorta B6 podczas wszystkich trzech pomiarów wykazywała stabilne parametry socjalności podczas wszystkich trzech pomiarów¹³⁶. Badania na linii BTBR, która stosowana jest jako myszy model ASD¹²² wykazały, że wskaźnik zainteresowania zapachem społecznym zwierząt linii BTBR wzrastał wraz z upływem czasu¹³⁶. Nie można więc wykluczyć, że w ciągu pierwszych 10 minut prezentacji bodźca w Eco-HAB™ samice KO również były mniej zainteresowane, natomiast pomiar z całej godziny zneutralizował ten efekt. Na podstawie uzyskanych danych można więc stwierdzić, że MMP-9 jest niezbędne do zajścia zmian w zachowaniu względem nieznanego bodźca po wczesnej stymulacji układu odpornościowego. Co istotne, brak różnic między zwierzętami WT i KO z grup kontrolnych wskazuje, że sam brak aktywnego MMP-9 nie ma wpływu na zachowania społeczne zwierząt.

Zymografia żelowa wykazała, że po podaniu LPS u obu płci wzrastała aktywność żelatynolityczna związana z białkiem MMP-9 w przednich częściach kory mózgu (ryc.4.22). Ta część OUN odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu zachowań społecznych, wpływając na sposób, w jaki jednostki wchodzi w interakcje z innymi oraz przetwarzają informacje społeczne^{259–261}. Jednym z kluczowych obszarów przedniej części

kory mózgu zaangażowanych w kontrolę zachowań społecznych jest przednia częśći zakrętu obręczy (ang. *anterior cingulate cortex*, ACC)²⁵⁹. W jednych z najnowszych badań na makakach wykazano, że neurony ACC preferencyjnie aktywują się pod wpływem bodźców społecznych²⁶². W modelach zaburzeń neurorozwojowych szczególną uwagę przykładają się do zmian zachodzących w tej strukturze². W genetycznym, mysim modelu ASD opierającym się na wyciszeniu genu *shank3* związanym ze stabilizacją połączeń synaptycznych, obserwuje się obniżoną socjalność^{17,172}. W pracy Guo i współpracowników²⁶³, selektywne wyciszenie *shank3* w ACC również skutkowało zaburzeniami społecznymi, co stanowi kolejny dowód na rolę tej struktury w kontroli zachowań społecznych. U zwierząt pozbawionych białka Shank3 obserwuje się również niższą pobudliwość neuronów piramidowych w ACC, co jest związane z niższą liczbą kolców dendrytycznych²⁶³. W pracy Cao i współautorów, podanie 0,05 mg/kg m. c. LPS w P14 prowadziło do wyższej dynamiki kolców dendrytycznych (zwiększone powstawanie nowych synaps i zwiększona eliminacja) w ACC, przy czym zagęszczenie kolców dendrytycznych było niższe w porównaniu do grupy kontrolnej⁹⁰. Badania plastyczności synaptycznej przeprowadzono na dorosłych zwierzętach, co może sugerować, że podanie LPS wpływa na utrzymującą się w dorosłości dezorganizację w sieci neuronalnej ACC⁹⁰. MMP-9, co zostało szerzej opisane we wstępie, pełni kluczowe funkcje przy przebudowie kolców dendrytycznych pod wpływem różnych bodźców^{147,158,161}. Wzrost aktywności enzymatycznej związanej z MMP-9 w przednich częściach mózgu myszy, może prowadzić do przemodelowania połączeń synaptycznych, a w konsekwencji do zmian w reakcji na bodziec społeczny. Tłumaczyłoby to też, dlaczego u zwierząt pozbawionych białka MMP-9, zmiany w tym aspekcie zachowania nie zaszły pod wpływem podania LPS.

Zespół łamliwego chromosomu X (ang. *fragile X syndrome*, FXS) jest zaburzeniem genetycznym związanym z mutacją w genie *fmr1*, która prowadzi do braku białka FMRP (ang. *fragile X messenger ribonucleoprotein*, FMRP)²⁶⁴. FXS jest najczęstszą dziedziczną przyczyną niepełnosprawności intelektualnej i jednym z głównych genetycznych czynników ryzyka ASD. Szacuje się, że nawet 5% zdiagnozowanych przypadków ASD związane jest z FXS^{166,265}. Jednym z klinicznych objawów FXS jest podwyższony poziom MMP-9 we krwi oraz w mózgu^{19,28,140,264}. W badaniach na modelach zwierzęcych opierających się na nokaucie genu *fmr1* obserwuje się obniżoną aktywność, zwiększoną lękliwość, nadwrażliwość sensoryczną, a także zaburzenia w socjalności (zarówno względem nieznanego osobnika, jak i w grupie)^{134,265–267}. Poprzez obniżanie poziomu MMP-9 podejmowano się próby złagodzenia fenotypu (ang. *phenotype rescue*) u pacjentów,

a także w mysim modelu. Podanie minocykliny, antybiotyku hamującego aktywność MMP-9, prowadziło do obniżenia poziomu enzymu we krwi pacjentów²⁸, a w mysich modelach łagodziło objawy behawioralne^{174,175,268,269}. W pracy Puścian i współpracowników¹¹² podanie TIMP-1 do ciała migdałowatego myszy FMR1 KO poprawiło funkcje kognitywne zwierząt oraz obniżyło poziom lęku, ale co interesujące nie wpłynęło na poprawę zaburzeń społecznych. Można więc zadać pytanie czy zahamowanie działania MMP-9 w innych częściach mózgu, np. w przednich częściach kory mózgu lub w hipokampie, mogłoby wpłynąć na inne aspekty zmian behawioralnych w tym modelu. Podobne pytanie zadano w pracy Winiarskiego i współpracowników²⁷⁰, gdzie dorosłym myszom dzikiego typu podano TIMP1 do przednich części kory mózgu. Po zahamowaniu aktywności MMP-9 w tej części OUN zaobserwowano, że zwierzęta wykazywały obniżone zainteresowanie atrakcyjną informacją społeczną (ściółka z klatki znanej myszy, która otrzymała cukier). W przeciwieństwie do tego, myszy z niezmienną aktywnością MMP-9 chętnie eksplorowały bodziec²⁷⁰. Wynik ten podkreśla rolę MMP-9 w komunikacji socjalnej, choć pełne poznanie molekularnego mechanizmu wymaga dalszych badań. W niniejszej rozprawie podwyższony poziom MMP-9 (zarówno ilościowy we krwi, wyższa aktywność enzymatyczna czy ekspresja genu *mmp-9*) obserwowano po podaniu LPS. Nasuwa się więc pytanie, czy zahamowanie aktywności MMP-9, np. minocykliną, podaniem TIMP-1 lub innym inhibitorem metaloproteaz, w czasie stanu zapalnego złagodziłoby wpływ wczesnej stymulacji układu odpornościowego na socjalność.

5.5 Hipotetyczny mechanizm stojący za zmianami w zachowaniu zwierząt poddanych wczesnej stymulacji układu odpornościowego

Podanie LPS aktywuje ścieżkę sygnałową TLR4-Myd88-NF- κ B. Pomimo wykazania, że u młodych zwierząt mniej cytokin jest wykrywanych w trakcie stanu zapalnego, to biorąc w nim udział czynniki związane z rozszczelnianiem BBB, tj. MMP-9, CCL5 oraz TNF α ^{271–276}. Większość prac dotyczących przepuszczalności BBB i czynników wpływających na jej degradację dotyczy badań nad udarem, stanem sepsy lub chorobami neurodegeneracyjnymi^{277,278}. Obecnie pojawia się więcej dowodów na rolę BBB i dysfunkcji w jej funkcjonowaniu w zaburzeniach neurorozwojowych^{5,6,29,279}. W pracy Logsdon i współpracowników²⁸⁰, zaprezentowano, że kilkukrotne podanie LPS mysim oseskom w wieku P9 powoduje większą przepuszczalność BBB. Przeciwnie wyniki zaprezentowano w publikacji Wang i współpracowników²⁸¹, gdzie pojedyncze

dootrzewnowe podanie LPS nie wpłynęło na BBB. Warto jednak dodać, że we wspomnianej pracy nie zaobserwowano zmienionej ekspresji genów związanych z aktywacją TLR4 w mózgu, co zaprezentowano w niniejszej rozprawie (wzrost ekspresji genów *mmp-9*, *tnf-α* oraz *il-6*). Podanie dootrzewnowe LPS spowodowało aktywację układu odpornościowego i uwolnienie między innymi IL-6, która po przekroczeniu BBB mogła zainicjować mikroglej, astrocyty oraz pericyty do odpowiedzi odpornościowej w OUN. W takim przebiegu MMP-9, CCL5 oraz TNF-α uwalniane zarówno przez komórki we krwi (neutrofile, monocyty, makrofagi), jak i komórki rezydujące w OUN mogły się przyczynić do zwiększenia przepuszczalności BBB. W takiej sytuacji wyższa aktywność żelatynolityczna MMP-9 w korze mózgu obu płci i w hipokampie samców, poza dalszą degradacją BBB, mogła także prowadzić do przebudowy sieci synaptycznej. Co ciekawe, brak MMP-9 nie chroni całkowicie przed degradacją BBB, co zaprezentowano w modelu wirusowego stanu zapalnego²⁸². Taki stan tłumaczyłby dlaczego u zwierząt MMP-9 KO pojawiły się niektóre efekty podania LPS. Kolejną konsekwencją zwiększonej przepuszczalności BBB jest naciek komórek odpornościowych z obwodu do OUN²⁸³. W kontekście uzyskanych wyników warto także dodać, że migrację komórek dendrytycznych oraz monocytów jest promowana przez CCL5^{273,284}. Makrofagi lub monocyty mogące różnicować w makrofagi (ang. *monocyte-derived macrophage*, makrofag pochodzenia monocytarnego, MDM), które dostaną się do OUN, mogą pełnić podobne funkcje do mikrogleju^{285,286}. Warto jednak dodać, że komórki te mimo funkcjonalnych podobieństw różnią się pod kątem molekularnym^{283,287}. Przykładem może być tutaj białko TMEM119 charakterystyczne dla mikrogleju lub białka MHC II, które są intensywnie ekspresjonowane przez komórki MDM²⁸³. W badaniach autorstwa Cronk i współpracowników²⁸⁸ wykazano, że MDM rezydujące w mózgu różnią się od mikrogleju między innymi wyższą ekspresją genów związanych z sygnalizacją i produkcją czynników wzrostu czy interakcją z macierzą zewnątrzkomórkową. Co ciekawe, w niektórych modelach neonatalnej stymulacji układu odpornościowego LPS zaobserwowano wzrost liczby komórek Iba-1-pozytywnych w OUN^{90,219,289,290}. Dodatkowo komórki te pod względem morfologicznym wskazywały na wyższą aktywność fagocytarną^{90,219,289,290}. Wskaźnik molekularny Iba-1, nie rozróżnia jednak mikrogleju od komórek MDM, dlatego też nie można wykluczyć, że obie te frakcje komórkowe były obecne w mózgach zwierząt²⁹¹. Biorąc pod uwagę, że mikroglej bierze aktywną rolę w procesie rozwojowej eliminacji synaps (ang. *synapse pruning*)²⁹², nie można wykluczyć, że w badanym modelu również komórki MDM brały udział w tym procesie. Inna odpowiedź na sygnały

komórkowe mogła prowadzić do nieodwracalnych zmian w przebudowie sieci komórkowej przez sam mikroglej oraz przez mikroglej wspierany przez MDM. Natomiast zaburzenia rozwoju sieci komórkowych mogły stać za zmianami w zachowaniu stymulowanych LPS myszy.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W przedłożonej rozprawie wykazano, że wczesna stymulacja układu odpornościowego czynnikiem o pochodzeniu bakteryjnym – lipopolisacharydem – prowadzi do długotrwałych zmian w zachowaniu zwierząt. Zaobserwowane zmiany obejmowały trzy aspekty behawioru: aktywność, emocjonalność oraz socjalność i przypominały one objawy obserwowane wśród pacjentów z zaburzeniami neurorozwojowymi. Wykazano również, że siedmiodniowe myszy płci męskiej i żeńskiej różnią się zarówno przebiegiem reakcji zapalnej, jak i zmianami behawioralnymi, które utrzymują się w dorosłości w wyniku podania LPS. Po raz pierwszy pokazano także, że białko MMP-9 jest niezbędne do zajścia zmian w reakcji na nieznany bodziec społeczny pod wpływem wczesnej stymulacji układu odpornościowego czynnikiem bakteryjnym.

W szczególności w niniejszej rozprawie wykazano że:

- 1) Samce traktowane LPS w P7 wykazywały się obniżoną aktywnością, zaburzoną emocjonalnością (obniżona lękliwość w grupie B6, podwyższona lękliwość oraz wzmożony *self-grooming* wśród zwierząt linii MMP-9 KO) oraz zmienione zachowania socjalne (obniżone zainteresowanie nieznany bodźcem społecznym, chętniejsze spędzanie czasu w grupie);
- 2) Samice poddane iniekcji LPS w P7, charakteryzowały się niższą aktywnością, zaburzoną emocjonalnością (brak zmian w grupie B6, podwyższona lękliwość oraz wzmożony *self-grooming* wśród samic linii MMP-9 KO) oraz zmienioną socjalnością (większe zainteresowanie nieznany bodźcem społecznym i niższa preferencja do spędzania czasu w grupie);
- 3) Zmiany w zachowaniu samic (szczególnie kohorty B6) były obserwowane głównie podczas długotrwałej obserwacji w zautomatyzowanych klatkach;
- 4) We krwi najwyższe stężenie białek związanych z aktywacją ścieżki TLR4-MyD88-NFκB zaobserwowano po 2 godzinach od iniekcji, a odpowiedź odpornościowa była prawie wygaszona po 24 godzinach. Dodatkowo, odpowiedź odpornościowa była silniejsza wśród samców;
- 5) U obydwu płci aktywność żelatynolityczna związana z białkiem MMP-9 była podwyższona 2 godziny po podaniu w przednich częściach kory mózgu, a u samców dodatkowo w hipokampie;

6) 6 godzin po podaniu LPS zaobserwowano wzrost ekspresji genów *il-6*, *tnf-α* oraz *mmp-9* w OUN – w szczególności w prążkowie;

7) U myszy pozbawionych aktywnego białka MMP-9 traktowanych w siódmym dniu życia LPS nie zaobserwowano zmian w reakcji na nieznany bodziec socjalny podczas długotrwałe prezentacji bodźca;

8) Efekt podania LPS na emocjonalność różnił się pomiędzy zwierzętami szczepu wsobnego B6 (obniżona lękliwość tylko wśród samców) oraz linii MMP-9 KO (wyższa lękliwość i wzrost *self-groomingu*, bez względu na płeć i genotyp).

Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

- Jednorazowa stymulacja układu odpornościowego w okresie intensywnej synaptogenezy może stanowić nowy mysi model zaburzeń neurorozwojowych;
- Ze względu na różnice między samcami i samicami, niezbędne jest prowadzenie badań na obu płciach, uwzględniając różnice w manifestacji objawów;
- MMP-9 jest niezbędna do zajścia zmian w socjalności obserwowanej po wczesnej stymulacji układu odpornościowego;
- Białko MMP-9 może być potencjalnym celem terapeutycznym i/lub wskaźnikiem molekularnym wykorzystywanym w terapii NDD.

7. BIBLIOGRAFIA

1. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5 (R))*. (American Psychiatric Association Publishing, Arlington, TX, 2013).
2. Sato, M., Nakai, N., Fujima, S., Choe, K. Y. & Takumi, T. Social circuits and their dysfunction in autism spectrum disorder. *Mol. Psychiatry* **28**, 3194–3206 (2023).
3. Pekala, M., Doliwa, M. & Kalita, K. Impact of maternal immune activation on dendritic spine development. *Dev. Neurobiol.* **81**, 524–545 (2021).
4. Rexrode, L. E. *i in*. Molecular profiling of the hippocampus of children with autism spectrum disorder. *Mol. Psychiatry* (2024) doi:10.1038/s41380-024-02441-8.
5. Aragón-González, A., Shaw, P. J. & Ferraiuolo, L. Blood-brain barrier disruption and its involvement in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 15271 (2022).
6. Stolp, H. B. & Dziegielewska, K. M. Review: Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **35**, 132–146 (2009).
7. Gentile, S. & Fusco, M. L. Neurodevelopmental outcomes in infants exposed in utero to antipsychotics: a systematic review of published data. *CNS Spectr.* **22**, 273–281 (2017).
8. May, T., Adesina, I., McGillivray, J. & Rinehart, N. J. Sex differences in neurodevelopmental disorders. *Curr. Opin. Neurol.* **32**, 622–626 (2019).
9. Harris, J. C. Social neuroscience, empathy, brain integration, and neurodevelopmental disorders. *Physiol. Behav.* **79**, 525–531 (2003).

10. Hollestein, V. *i in*. Excitatory/inhibitory imbalance in autism: the role of glutamate and GABA gene-sets in symptoms and cortical brain structure. *Transl. Psychiatry* **13**, 18 (2023).
11. Lepeta, K. *i in*. A normal genetic variation modulates synaptic MMP-9 protein levels and the severity of schizophrenia symptoms. *EMBO Mol. Med.* **9**, 1100–1116 (2017).
12. Antonarakis, S. E. *i in*. Down syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primers* **6**, 9 (2020).
13. Ma, V. K. *i in*. Prader-Willi and Angelman syndromes: Mechanisms and management. *Appl. Clin. Genet.* **16**, 41–52 (2023).
14. Fujimoto M. & Niikawa N. Fragile X syndrome. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu* **3**, 208–210 (1996).
15. Leblond, C. S. *i in*. Operative list of genes associated with autism and neurodevelopmental disorders based on database review. *Mol. Cell. Neurosci.* **113**, 103623 (2021).
16. Wang, T. *i in*. Large-scale targeted sequencing identifies risk genes for neurodevelopmental disorders. *Nat. Commun.* **11**, 4932 (2020).
17. Uchino, S. & Waga, C. SHANK3 as an autism spectrum disorder-associated gene. *Brain Dev.* **35**, 106–110 (2013).
18. Poot, M. Connecting the CNTNAP2 networks with neurodevelopmental disorders. *Mol. Syndromol.* **6**, 7–22 (2015).
19. Richter, J. D. & Zhao, X. The molecular biology of FMRP: new insights into fragile X syndrome. *Nat. Rev. Neurosci.* **22**, 209–222 (2021).
20. Jossin, Y. Reelin functions, mechanisms of action and signaling pathways during brain development and maturation. *Biomolecules* **10**, 964 (2020).

21. Cuchillo-Ibáñez, I., Andreo-Lillo, P., Pastor-Ferrándiz, L., Carratalá-Marco, F. & Sáez-Valero, J. Elevated plasma reelin levels in children with autism. *Front. Psychiatry* **11**, 242 (2020).
22. Han, V. X. *i in*. Maternal acute and chronic inflammation in pregnancy is associated with common neurodevelopmental disorders: a systematic review. *Transl. Psychiatry* **11**, 71 (2021).
23. Lewis, M. L., Kesler, M., Candy, S. A., Rho, J. M. & Pittman, Q. J. Comorbid epilepsy in autism spectrum disorder: Implications of postnatal inflammation for brain excitability. *Epilepsia* **59**, 1316–1326 (2018).
24. López-Aranda, M. F. *i in*. Postnatal immune activation causes social deficits in a mouse model of tuberous sclerosis: Role of microglia and clinical implications. *Sci Adv* **7**, eabf2073 (2021).
25. Shook, L. L., Kislal, S. & Edlow, A. G. Fetal brain and placental programming in maternal obesity: A review of human and animal model studies. *Prenat. Diagn.* **40**, 1126–1137 (2020).
26. Tamayo, J. M., Osman, H. C., Schwartz, J. J., Pinkerton, K. E. & Ashwood, P. Characterizing the neuroimmune environment of offspring in a novel model of maternal allergic asthma and particulate matter exposure. *J Neuroinflammation* **20**, (2023).
27. Robinson-Agramonte, M. de L. A. *i in*. Immune dysregulation in autism spectrum disorder: What do we know about it? *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 3033 (2022).
28. Dziembowska, M. *i in*. High MMP-9 activity levels in fragile X syndrome are lowered by minocycline. *Am. J. Med. Genet. A* **161A**, 1897–1903 (2013).
29. Zawadzka, A., Cieślik, M. & Adamczyk, A. The Role of Maternal Immune Activation in the Pathogenesis of Autism: A Review of the Evidence, Proposed Mechanisms and Implications for Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).

30. Azevedo Soares, C. *i in*. Predicting factors of neurodevelopmental performance in children with phenylketonuria. *Am. J. Med. Genet. A* **191**, 1525–1529 (2023).
31. Szypowska, A. *i in*. Treatment of classic phenylketonuria in Poland in the years 2009-2015 based on the database of the Polish National Health Fund. *Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab.* **26**, 118–124 (2020).
32. Koch, R. *i in*. Maternal phenylketonuria: an international study. *Mol. Genet. Metab.* **71**, 233–239 (2000).
33. Wyse, A. T. S., Dos Santos, T. M., Seminotti, B. & Leipnitz, G. Insights from animal models on the pathophysiology of hyperphenylalaninemia: Role of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and inflammation. *Mol. Neurobiol.* **58**, 2897–2909 (2021).
34. Chen, K.-R., Yu, T., Lien, Y.-J., Chou, Y.-Y. & Kuo, P.-L. Childhood neurodevelopmental disorders and maternal diabetes: A population-based cohort study. *Dev. Med. Child Neurol.* **65**, 933–941 (2023).
35. Rodolaki, K. *i in*. The impact of maternal diabetes on the future health and neurodevelopment of the offspring: a review of the evidence. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **14**, 1125628 (2023).
36. Xie, X.-N., Lei, X., Xiao, C.-Y., Li, Y.-M. & Lei, X.-Y. Association between type 1 diabetes and neurodevelopmental disorders in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. *Front. Psychiatry* **13**, 982696 (2022).
37. Karam, B. S., Chavez-Moreno, A., Koh, W., Akar, J. G. & Akar, F. G. Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* **16**, 120 (2017).
38. Socha, D. S., DeSouza, S. I., Flagg, A., Sekeres, M. & Rogers, H. J. Severe megaloblastic anemia: Vitamin deficiency and other causes. *Cleve. Clin. J. Med.* **87**, 153–164 (2020).

39. Mikkelsen, K., Stojanovska, L. & Apostolopoulos, V. The effects of vitamin B in depression. *Curr. Med. Chem.* **23**, 4317–4337 (2016).
40. Copp, A. J. Neural tube defects. *Trends Neurosci.* **16**, 381–383 (1993).
41. Bath, S. C. The effect of iodine deficiency during pregnancy on child development. *Proc. Nutr. Soc.* **78**, 150–160 (2019).
42. Gargari, S. S. *i in*. Maternal and neonatal outcomes and determinants of iodine deficiency in third trimester of pregnancy in an iodine sufficient area. *BMC Pregnancy Childbirth* **20**, 174 (2020).
43. Keegan, J., Parva, M., Finnegan, M., Gerson, A. & Belden, M. Addiction in pregnancy. *J. Addict. Dis.* **29**, 175–191 (2010).
44. Kellogg, A., Rose, C. H., Harms, R. H. & Watson, W. J. Current trends in narcotic use in pregnancy and neonatal outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **204**, 259.e1–4 (2011).
45. Nutt, D. *i in*. Alcohol and the brain. *Nutrients* **13**, 3938 (2021).
46. Bailey, B. A. & Sokol, R. J. Prenatal alcohol exposure and miscarriage, stillbirth, preterm delivery, and sudden infant death syndrome. *Alcohol Res. Health* **34**, 86–91 (2011).
47. Streissguth, A. P. *i in*. Risk factors for adverse life outcomes in fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects. *J. Dev. Behav. Pediatr.* **25**, 228–238 (2004).
48. Paul, S., Nahar, A., Bhagawati, M. & Kunwar, A. J. A review on recent advances of cerebral palsy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2022**, 2622310 (2022).
49. Wilczynski, G. M. *i in*. Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. *J. Cell Biol.* **180**, 1021–1035 (2008).
50. Szpindel, A. *i in*. Epilepsy in children with cerebral palsy: a data linkage study. *Dev. Med. Child Neurol.* **64**, 259–265 (2022).
51. Makris, G., Eleftheriades, A. & Pervanidou, P. Early life stress, hormones, and neurodevelopmental disorders. *Horm. Res. Paediatr.* **96**, 17–24 (2023).

52. van IJzendoorn, M. H. *i in*. Children in Institutional Care: Delayed Development and Resilience. *Monogr. Soc. Res. Child Dev.* **76**, 8–30 (2011).
53. Smith, K. E. & Pollak, S. D. Early life stress and development: potential mechanisms for adverse outcomes. *J. Neurodev. Disord.* **12**, 34 (2020).
54. Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *Lancet* **357**, 1777–1789 (2001).
55. Burkly, L. C., Michaelson, J. S. & Zheng, T. S. TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses: TWEAKing tissue responses. *Immunol. Rev.* **244**, 99–114 (2011).
56. Alberts, B. *i in*. *Lymphocytes and the cellular basis of adaptive immunity*. (Garland Science, London, England, 2002).
57. Sompayrac, L. *How the Immune System Works*. (Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, 2012).
58. Alberts, B. *i in*. *Innate Immunity*. (Garland Science, London, England, 2002).
59. Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H. Y. & Wang, R.-F. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. *Front. Immunol.* **13**, 812774 (2022).
60. Lu, Y.-C., Yeh, W.-C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145–151 (2008).
61. Ciesielska, A., Matyjek, M. & Kwiatkowska, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 1233–1261 (2021).
62. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* **2**, 17023- (2017).
63. Kagan, J. C. *i in*. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.* **9**, 361–368 (2008).

64. Klein, S. L. & Flanagan, K. L. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 626–638 (2016).
65. Rio, P. *i in*. Immune cells, gut Microbiota, and vaccines: A gender perspective. *Cells* **13**, (2024).
66. Sarmiento, L., Svensson, J., Barchetta, I., Giwerzman, A. & Cilio, C. M. Copy number of the X-linked genes TLR7 and CD40L influences innate and adaptive immune responses. *Scand. J. Immunol.* **90**, e12776 (2019).
67. Hoffmann, J. P., Liu, J. A., Seddu, K. & Klein, S. L. Sex hormone signaling and regulation of immune function. *Immunity* **56**, 2472–2491 (2023).
68. Koçar, I. H. *i in*. The effect of testosterone replacement treatment on immunological features of patients with Klinefelter's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **121**, 448–452 (2000).
69. Quatrini, L., Ricci, B., Ciancaglini, C., Tumino, N. & Moretta, L. Regulation of the immune system development by glucocorticoids and sex hormones. *Front. Immunol.* **12**, 672853 (2021).
70. Kovats, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell. Immunol.* **294**, 63–69 (2015).
71. Gal-Oz, S. T. *i in*. ImmGen report: sexual dimorphism in the immune system transcriptome. *Nat. Commun.* **10**, 4295 (2019).
72. Scotland, R. S., Stables, M. J., Madalli, S., Watson, P. & Gilroy, D. W. Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice. *Blood* **118**, 5918–5927 (2011).
73. Smith, C. J. *i in*. Neonatal immune challenge induces female-specific changes in social behavior and somatostatin cell number. *Brain Behav. Immun.* **90**, 332–345 (2020).
74. Juruena, M. F., Eror, F., Cleare, A. J. & Young, A. H. The role of early life stress in HPA axis and anxiety. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1191**, 141–153 (2020).

75. Zefferino, R., Di Gioia, S. & Conese, M. Molecular links between endocrine, nervous and immune system during chronic stress. *Brain Behav.* **11**, e01960 (2021).
76. Garaschuk, O. & Verkhratsky, A. Microglia: The neural cells of nonneural origin. *Methods Mol. Biol.* **2034**, 3–11 (2019).
77. Obermeier, B., Daneman, R. & Ransohoff, R. M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat. Med.* **19**, 1584–1596 (2013).
78. Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R. & Begley, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**, 13–25 (2010).
79. Alarcon-Martinez, L., Yemisci, M. & Dalkara, T. Pericyte morphology and function. *Histol. Histopathol.* **36**, 633–643 (2021).
80. Tonutti, A. *i in*. The role of WNT and IL-1 signaling in osteoarthritis: therapeutic implications for platelet-rich plasma therapy. *Front. Aging* **4**, 1201019 (2023).
81. Lautarescu, A., Craig, M. C. & Glover, V. Prenatal stress: Effects on fetal and child brain development. *Int. Rev. Neurobiol.* **150**, 17–40 (2020).
82. Bao, M., Hofsink, N. & Plösch, T. LPS versus Poly I:C model: comparison of long-term effects of bacterial and viral maternal immune activation on the offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **322**, R99–R111 (2022).
83. Bucknor, M. C., Gururajan, A., Dale, R. C. & Hofer, M. J. A comprehensive approach to modeling maternal immune activation in rodents. *Front. Neurosci.* **16**, 1071976 (2022).
84. Parusel, R. *i in*. An important question: Which LPS do you use? *Virulence* **8**, 1890–1893 (2017).
85. Tarr, A. J., Chen, Q., Wang, Y., Sheridan, J. F. & Quan, N. Neural and behavioral responses to low-grade inflammation. *Behav. Brain Res.* **235**, 334–341 (2012).

86. Couch, Y. *i in.* Low-dose lipopolysaccharide (LPS) inhibits aggressive and augments depressive behaviours in a chronic mild stress model in mice. *J. Neuroinflammation* **13**, 108 (2016).
87. Hoogland, I. C. M., Houbolt, C., van Westerloo, D. J., van Gool, W. A. & van de Beek, D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J. Neuroinflammation* **12**, 114 (2015).
88. Skrzypczak-Wiercioch, A. & Sałat, K. Lipopolysaccharide-induced model of neuroinflammation: Mechanisms of action, research application and future directions for its use. *Molecules* **27**, 5481 (2022).
89. Qiu, Z. *i in.* Consecutive injection of high-dose lipopolysaccharide modulates microglia polarization via TREM2 to alter status of septic mice. *Brain Sci.* **13**, 126 (2023).
90. Cao, P. *i in.* Early-life inflammation promotes depressive symptoms in adolescence via microglial engulfment of dendritic spines. *Neuron* **109**, 2573-2589.e9 (2021).
91. Fitzgerald, E., Boardman, J. P. & Drake, A. J. Early life stress and LPS interact to modify the mouse cortical transcriptome in the neonatal period. *Brain Behav. Immun. Health* **13**, 100219 (2021).
92. Kentner, A. C., McLeod, S. A., Field, E. F. & Pittman, Q. J. Sex-dependent effects of neonatal inflammation on adult inflammatory markers and behavior. *Endocrinology* **151**, 2689–2699 (2010).
93. Solek, C. M., Farooqi, N., Verly, M., Lim, T. K. & Ruthazer, E. S. Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Dev. Dyn.* **247**, 588–619 (2018).
94. Wu, X.-Q. *i in.* Neonatal programming by immunological challenge: effects on ovarian function in the adult rat. *J Reprod Fertil* **141**, 241–248 (2011).

95. Réus, G. Z. *i in*. Ketamine potentiates oxidative stress and influences behavior and inflammation in response to lipopolysaccharide (LPS) exposure in early life. *Neuroscience* **353**, 17–25 (2017).
96. Runge, K., Cardoso, C. & de Chevigny, A. Dendritic spine plasticity: Function and mechanisms. *Front. Synaptic Neurosci.* **12**, 36 (2020).
97. Zeiss, C. J. Comparative milestones in rodent and human postnatal central nervous system development. *Toxicol. Pathol.* **49**, 1368–1373 (2021).
98. Vivi, E. & Di Benedetto, B. Brain stars take the lead during critical periods of early postnatal brain development: relevance of astrocytes in health and mental disorders. *Mol. Psychiatry* **29**, 2821–2833 (2024).
99. Christopherson, K. S. *i in*. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* **120**, 421–433 (2005).
100. Han, X. *i in*. Transcriptome of embryonic and neonatal mouse cortex by high-throughput RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12741–12746 (2009).
101. Kirov, S. A., Goddard, C. A. & Harris, K. M. Age-dependence in the homeostatic upregulation of hippocampal dendritic spine number during blocked synaptic transmission. *Neuropharmacology* **47**, 640–648 (2004).
102. Zhong, J., Carrozza, D. P., Williams, K., Pritchett, D. B. & Molinoff, P. B. Expression of mRNAs encoding subunits of the NMDA receptor in developing rat brain. *J. Neurochem.* **64**, 531–539 (1995).
103. Dupuis, J. P., Nicole, O. & Groc, L. NMDA receptor functions in health and disease: Old actor, new dimensions. *Neuron* **111**, 2312–2328 (2023).
104. Wong, F. K. & Marín, O. Developmental cell death in the cerebral cortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **35**, 523–542 (2019).

105. Nikolić, M., Gardner, H. A. R. & Tucker, K. L. Postnatal neuronal apoptosis in the cerebral cortex: physiological and pathophysiological mechanisms. *Neuroscience* **254**, 369–378 (2013).
106. Stiles, J. & Jernigan, T. L. The basics of brain development. *Neuropsychol. Rev.* **20**, 327–348 (2010).
107. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M. & Noble-Haeusslein, L. J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog. Neurobiol.* **106–107**, 1–16 (2013).
108. Komada, M., Takao, K. & Miyakawa, T. Elevated plus maze for mice. *J. Vis. Exp.* (2008) doi:10.3791/1088.
109. Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F. & Renzi, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav. Brain Res.* **134**, 49–57 (2002).
110. Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. & Briley, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* **14**, 149–167 (1985).
111. Wang, D., Levine, J. L. S., Avila-Quintero, V., Bloch, M. & Kaffman, A. Systematic review and meta-analysis: effects of maternal separation on anxiety-like behavior in rodents. *Transl. Psychiatry* **10**, (2020).
112. Puścian, A. *i in*. Targeted therapy of cognitive deficits in fragile X syndrome. *Mol. Psychiatry* **27**, 2766–2776 (2022).
113. Ang, M. J., Lee, S., Kim, J.-C., Kim, S.-H. & Moon, C. Behavioral tasks evaluating schizophrenia-like symptoms in animal models: A recent update. *Curr. Neuropharmacol.* **19**, 641–664 (2021).

114. Nomiya, H. *i in.* A Kpna1-deficient psychotropic drug-induced schizophrenia model mouse for studying gene-environment interactions. *Sci. Rep.* **14**, 3376 (2024).
115. Puzzo, C., Festucci, F., Curcio, G., Gigantesco, A. & Adriani, W. Exploring transgenerational inheritance in epigenotypes of DAT heterozygous rats: Circadian anomalies and attentional vulnerability. *Behav. Brain Res.* **464**, 114921 (2024).
116. Viggiano, D. & Sadile, A. G. Hypertrophic A10 dopamine neurones in a rat model of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neuroreport* **11**, 3677–3680 (2000).
117. Tucker, L. B. & McCabe, J. T. Behavior of male and female C57BL/6J mice is more consistent with repeated trials in the elevated zero maze than in the elevated plus maze. *Front. Behav. Neurosci.* **11**, 13 (2017).
118. Angelakos, C. C., Tudor, J. C., Ferri, S. L., Jongens, T. A. & Abel, T. Home-cage hypoactivity in mouse genetic models of autism spectrum disorder. *Neurobiol. Learn. Mem.* **165**, 107000 (2019).
119. Payne, H. L. The role of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins (TARPs) in neurotransmission and receptor trafficking (Review). *Mol. Membr. Biol.* **25**, 353–362 (2008).
120. Menuz, K. & Nicoll, R. A. Loss of inhibitory neuron AMPA receptors contributes to ataxia and epilepsy in stargazer mice. *J. Neurosci.* **28**, 10599–10603 (2008).
121. Schirmer, C. *i in.* Home-cage behavior in the Stargazer mutant mouse. *Sci. Rep.* **12**, 12801 (2022).
122. Ornoy, A., Echefu, B. & Becker, M. Animal models of autistic-like behavior in rodents: A scoping review and call for a comprehensive scoring system. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, (2024).

123. Ryan, K., Thompson, L., Mendoza, P. A. & Chadman, K. K. Inbred strain preference in the BTBR T+ Itpr3tf /J mouse model of autism spectrum disorder: Does the stranger mouse matter in social approach? *Autism Res.* **12**, 1184–1191 (2019).
124. Cristino, L. M. F. *i in*. Animal Model of Neonatal Immune Challenge by Lipopolysaccharide: A Study of Sex Influence in Behavioral and Immune/Neurotrophic Alterations in Juvenile Mice. *Neuroimmunomodulation* **29**, 391–401 (2022).
125. Carlezon, W. A., Jr *i in*. Maternal and early postnatal immune activation produce sex-specific effects on autism-like behaviors and neuroimmune function in mice. *Sci. Rep.* **9**, 16928 (2019).
126. Landauer, M. R. & Balster, R. L. A new test for social investigation in mice: effects of d-amphetamine. *Psychopharmacology (Berl.)* **78**, 322–325 (1982).
127. Szabó, J., Renczés, E., Borbélyová, V., Ostatníková, D. & Celec, P. Assessing sociability using the Three-Chamber Social Interaction Test and the Reciprocal Interaction Test in a genetic mouse model of ASD. *Behav. Brain Funct.* **20**, 24 (2024).
128. Kaidanovich-Beilin, O., Lipina, T., Vukobradovic, I., Roder, J. & Woodgett, J. R. Assessment of social interaction behaviors. *J. Vis. Exp.* (2011) doi:10.3791/2473.
129. Jabarin, R., Netser, S. & Wagner, S. Beyond the three-chamber test: toward a multimodal and objective assessment of social behavior in rodents. *Mol. Autism* **13**, 41 (2022).
130. Kim, D. G. *i in*. Social interaction test in home cage as a novel and ethological measure of social behavior in mice. *Exp. Neurobiol.* **28**, 247–260 (2019).
131. Takumi, T., Tamada, K., Hatanaka, F., Nakai, N. & Bolton, P. F. Behavioral neuroscience of autism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **110**, 60–76 (2020).

132. Ryan, B. C., Young, N. B., Moy, S. S. & Crawley, J. N. Olfactory cues are sufficient to elicit social approach behaviors but not social transmission of food preference in C57BL/6J mice. *Behav. Brain Res.* **193**, 235–242 (2008).
133. Zhang, J.-B. *i in*. Oxytocin is implicated in social memory deficits induced by early sensory deprivation in mice. *Mol. Brain* **9**, (2016).
134. Puścian, A. *i in*. Eco-HAB as a fully automated and ecologically relevant assessment of social impairments in mouse models of autism. *Elife* **5**, (2016).
135. Kiryk, A. *i in*. IntelliCage as a tool for measuring mouse behavior - 20 years perspective. *Behav. Brain Res.* **388**, 112620 (2020).
136. Winiarski, M. *i in*. Social deficits in BTBR T+ Itpr3tf/J mice vary with ecological validity of the test. *Genes Brain Behav.* **21**, e12814 (2022).
137. Roszkowska, M. *i in*. SRF depletion in early life contributes to social interaction deficits in the adulthood. *Cell. Mol. Life Sci.* **79**, 278 (2022).
138. Dityatev, A. & Rusakov, D. A. Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* **21**, 353–359 (2011).
139. de Almeida, L. G. N. *i in*. Matrix metalloproteinases: From molecular mechanisms to physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **74**, 712–768 (2022).
140. Beroun, A. *i in*. MMPs in learning and memory and neuropsychiatric disorders. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 3207–3228 (2019).
141. Vafadari, B., Salamian, A. & Kaczmarek, L. MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. *J. Neurochem.* **139 Suppl 2**, 91–114 (2016).
142. Vandooren, J., Van den Steen, P. E. & Opdenakker, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 222–272 (2013).

143. Hannocks, M.-J. *i in.* The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes. *Matrix Biol.* **75–76**, 102–113 (2019).
144. Rivera, S., Khrestchatisky, M., Kaczmarek, L., Rosenberg, G. A. & Jaworski, D. M. Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? *J. Neurosci.* **30**, 15337–15357 (2010).
145. Vu, T. H. *i in.* MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* **93**, 411–422 (1998).
146. Yabluchanskiy, A., Ma, Y., Iyer, R. P., Hall, M. E. & Lindsey, M. L. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)* **28**, 391–403 (2013).
147. Dziembowska, M. & Wlodarczyk, J. MMP9: a novel function in synaptic plasticity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 709–713 (2012).
148. Pijet, B. *i in.* Elevation of MMP-9 Levels Promotes Epileptogenesis After Traumatic Brain Injury. *Mol. Neurobiol.* **55**, 9294–9306 (2018).
149. Szklarczyk, A., Lapinska, J., Rylski, M., McKay, R. D. G. & Kaczmarek, L. Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J. Neurosci.* **22**, 920–930 (2002).
150. Iroegbu, J. D., Ijomone, O. K., Femi-Akinlosotu, O. M. & Ijomone, O. M. ERK/MAPK signalling in the developing brain: Perturbations and consequences. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **131**, 792–805 (2021).
151. Pitkänen, A. *i in.* Chapter 11 - Neural ECM and epilepsy. w *Progress in Brain Research* (red. Dityatev, A., Wehrle-Haller, B. & Pitkänen, A.) t. 214 229–262 (Elsevier, 2014).
152. Okulski, P. *i in.* TIMP-1 abolishes MMP-9-dependent long-lasting long-term potentiation in the prefrontal cortex. *Biol. Psychiatry* **62**, 359–362 (2007).

153. Charzewski, Ł., Krzyśko, K. A. & Lesyng, B. Structural characterisation of inhibitory and non-inhibitory MMP-9-TIMP-1 complexes and implications for regulatory mechanisms of MMP-9. *Sci. Rep.* **11**, 13376 (2021).
154. Reininghaus, E. Z. *i in*. Extracellular matrix proteins matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) and correlations with clinical staging in euthymic bipolar disorder. *Bipolar Disord.* **18**, 155–163 (2016).
155. Ning, L. *i in*. Interactions between ICAM-5 and $\beta 1$ integrins regulate neuronal synapse formation. *J. Cell Sci.* **126**, 77–89 (2013).
156. Mizoguchi, H. *i in*. Matrix metalloproteinase-9 contributes to kindled seizure development in pentylenetetrazole-treated mice by converting pro-BDNF to mature BDNF in the hippocampus. *J. Neurosci.* **31**, 12963–12971 (2011).
157. Cheng, M. *i in*. MMP-9-BDNF pathway is implicated in cognitive impairment of male individuals with methamphetamine addiction during early withdrawal. *Behav. Brain Res.* **366**, 29–35 (2019).
158. Michaluk, P. *i in*. Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *J. Cell Sci.* **124**, 3369–3380 (2011).
159. Bijata, M. *i in*. Synaptic Remodeling Depends on Signaling between Serotonin Receptors and the Extracellular Matrix. *Cell Rep.* **19**, 1767–1782 (2017).
160. Dziembowska, M. *i in*. Activity-dependent local translation of matrix metalloproteinase-9. *J. Neurosci.* **32**, 14538–14547 (2012).
161. Wang, X.-B. *i in*. Extracellular proteolysis by matrix metalloproteinase-9 drives dendritic spine enlargement and long-term potentiation coordinately. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19520–19525 (2008).
162. Baltaci, S. B., Mogulkoc, R. & Baltaci, A. K. Molecular mechanisms of early and late LTP. *Neurochem. Res.* **44**, 281–296 (2019).

163. Kruijssen, D. L. H. & Wierenga, C. J. Single synapse LTP: A matter of context? *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 496 (2019).
164. Nagy, V. *i in*. Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J. Neurosci.* **26**, 1923–1934 (2006).
165. Knapska, E. *i in*. Reward learning requires activity of matrix metalloproteinase-9 in the central amygdala. *J. Neurosci.* **33**, 14591–14600 (2013).
166. Kaczmarek, K. T., Protokowicz, K. & Kaczmarek, L. Matrix metalloproteinase-9: A magic drug target in neuropsychiatry? *J. Neurochem.* (2023) doi:10.1111/jnc.15976.
167. Schoretsanitis, G. *i in*. Matrix Metalloproteinase 9 Blood Alterations in Patients With Schizophrenia Spectrum Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Schizophr. Bull.* **47**, 986–996 (2021).
168. Dwir, D. *i in*. MMP9/RAGE pathway overactivation mediates redox dysregulation and neuroinflammation, leading to inhibitory/excitatory imbalance: a reverse translation study in schizophrenia patients. *Mol. Psychiatry* **25**, 2889–2904 (2020).
169. Seitz-Holland, J. *i in*. The association of matrix metalloproteinase 9 (MMP9) with hippocampal volume in schizophrenia: a preliminary MRI study. *Neuropsychopharmacology* **47**, 524–530 (2022).
170. Siller, S. S. & Broadie, K. Matrix metalloproteinases and minocycline: therapeutic avenues for fragile X syndrome. *Neural Plast.* **2012**, 124548 (2012).
171. Lord, J. R., Mashayekhi, F. & Salehi, Z. How matrix metalloproteinase (MMP)-9 (rs3918242) polymorphism affects MMP-9 serum concentration and associates with autism spectrum disorders: A case-control study in Iranian population. *Dev. Psychopathol.* **34**, 882–888 (2022).
172. Peça, J. *i in*. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* **472**, 437–442 (2011).

173. Trofimov, A. *i in.* Postnatal LPS Challenge Impacts Escape Learning and Expression of Plasticity Factors Mmp9 and Timp1 in Rats: Effects of Repeated Training. *Neurotox. Res.* **32**, 175–186 (2017).
174. Bilousova, T. V. *i in.* Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model. *J. Med. Genet.* **46**, 94–102 (2009).
175. Toledo, M. A., Wen, T. H., Binder, D. K., Ethell, I. M. & Razak, K. A. Reversal of ultrasonic vocalization deficits in a mouse model of Fragile X Syndrome with minocycline treatment or genetic reduction of MMP-9. *Behav. Brain Res.* **372**, 112068 (2019).
176. Andrzejewski, R. The home-range concept in rodents revised. *Acta Theriol.* **47**, 81–101 (2002).
177. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435 (2008).
178. Dinel, A.-L. *i in.* Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. *J. Neuroinflammation* **11**, 155 (2014).
179. Reed, M. D. *i in.* IL-17a promotes sociability in mouse models of neurodevelopmental disorders. *Nature* **577**, 249–253 (2020).
180. Zhong, H. *i in.* Neonatal inflammation via persistent TGF- β 1 downregulation decreases GABAAR expression in basolateral amygdala leading to the imbalance of the local excitation-inhibition circuits and anxiety-like phenotype in adult mice. *Neurobiol. Dis.* **169**, 105745 (2022).
181. Lei, Y., Chen, C.-J., Yan, X.-X., Li, Z. & Deng, X.-H. Early-life lipopolysaccharide exposure potentiates forebrain expression of NLRP3 inflammasome proteins and anxiety-like behavior in adolescent rats. *Brain Res.* **1671**, 43–54 (2017).

182. Chocyk, A., Majcher-Maślanka, I., Przyborowska, A., Maćkowiak, M. & Wędzony, K. Early-life stress increases the survival of midbrain neurons during postnatal development and enhances reward-related and anxiolytic-like behaviors in a sex-dependent fashion. *Int. J. Dev. Neurosci.* **44**, 33–47 (2015).
183. Jeon, Y.-S. *i in*. Adolescent parvalbumin expression in the left orbitofrontal cortex shapes sociability in female mice. *J. Neurosci.* **43**, 1555–1571 (2023).
184. Bicks, L. K. *i in*. Prefrontal parvalbumin interneurons require juvenile social experience to establish adult social behavior. *Nat. Commun.* **11**, 1003 (2020).
185. Tenk, C. M., Foley, K. A., Kavaliers, M. & Ossenkopp, K.-P. Neonatal immune system activation with lipopolysaccharide enhances behavioural sensitization to the dopamine agonist, quinpirole, in adult female but not male rats. *Brain Behav. Immun.* **21**, 935–945 (2007).
186. Berkiks, I. *i in*. The sex differences of the behavior response to early Life immune stimulation: Microglia and astrocytes involvement. *Physiol. Behav.* **199**, 386–394 (2019).
187. Palanza, P. & Parmigiani, S. How does sex matter? Behavior, stress and animal models of neurobehavioral disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **76**, 134–143 (2017).
188. Lee, H. S. & Kim, W. J. The role of matrix metalloproteinase in inflammation with a focus on infectious diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 10546 (2022).
189. Reinhard, S. M., Razak, K. & Ethell, I. M. A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 280 (2015).
190. Aujla, P. K. & Huntley, G. W. Early postnatal expression and localization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during establishment of rat hippocampal synaptic circuitry: MMP proteolysis during hippocampal development. *J. Comp. Neurol.* **522**, 1249–1263 (2014).

191. Sidhu, H., Dansie, L. E., Hickmott, P. W., Ethell, D. W. & Ethell, I. M. Genetic removal of matrix metalloproteinase 9 rescues the symptoms of fragile X syndrome in a mouse model. *J. Neurosci.* **34**, 9867–9879 (2014).
192. Fernández-Teruel, A. & Estanislau, C. Meanings of self-grooming depend on an inverted U-shaped function with aversiveness. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 591 (2016).
193. Biswas, B., Eapen, V., Morris, M. J. & Jones, N. M. Combined effect of maternal separation and early-life immune activation on brain and behaviour of rat offspring. *Biomolecules* **14**, 197 (2024).
194. Spencer, S. J., Heida, J. G. & Pittman, Q. J. Early life immune challenge--effects on behavioural indices of adult rat fear and anxiety. *Behav. Brain Res.* **164**, 231–238 (2005).
195. Spencer, S. J., Boissé, L., Mouihate, A. & Pittman, Q. J. Long term alterations in neuroimmune responses of female rats after neonatal exposure to lipopolysaccharide. *Brain Behav. Immun.* **20**, 325–330 (2006).
196. Tenk, C. M., Kavaliers, M. & Ossenkopp, K.-P. Sexually dimorphic effects of neonatal immune system activation with lipopolysaccharide on the behavioural response to a homotypic adult immune challenge. *Int. J. Dev. Neurosci.* **26**, 331–338 (2008).
197. Breivik, T. *i in*. Postnatal lipopolysaccharide-induced illness predisposes to periodontal disease in adulthood. *Brain Behav. Immun.* **16**, 421–438 (2002).
198. Sidor, M. M., Halgren, C. R. & Foster, J. A. The impact of early life immune challenge on behavior and microglia during postnatal development: DOI: 10.14800/ics.83. *ics* **1**, (2014).
199. Zubareva, O. E. *i in*. Exposure to bacterial lipopolysaccharide in early life affects the expression of ionotropic glutamate receptor genes and is accompanied by disturbances

in long-term potentiation and cognitive functions in young rats. *Brain Behav. Immun.* **90**, 3–15 (2020).

200. Cuskelly, A. *i in*. Neonatal immune challenge influences the microbiota and behaviour in a sexually dimorphic manner. *Brain Behav. Immun.* **103**, 232–242 (2022).

201. Majidi-Zolbanin, J., Azarfarin, M., Samadi, H., Enayati, M. & Salari, A.-A. Adolescent fluoxetine treatment decreases the effects of neonatal immune activation on anxiety-like behavior in mice. *Behav. Brain Res.* **250**, 123–132 (2013).

202. Stolp, H. B. *i in*. Effects of neonatal systemic inflammation on blood-brain barrier permeability and behaviour in juvenile and adult rats. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* **2011**, 1–10 (2011).

203. Rico, J. L. R., Ferraz, D. B., Ramalho-Pinto, F. J. & Morato, S. Neonatal exposure to LPS leads to heightened exploratory activity in adolescent rats. *Behav. Brain Res.* **215**, 102–109 (2010).

204. Bothe, G. W. M., Bolivar, V. J., Vedder, M. J. & Geistfeld, J. G. Behavioral differences among fourteen inbred mouse strains commonly used as disease models. *Comp. Med.* **55**, 326–334 (2005).

205. Sarkar, T., Patro, N. & Patro, I. K. Perinatal exposure to synergistic multiple stressors leads to cellular and behavioral deficits mimicking Schizophrenia-like pathology. *Biol. Open* **11**, (2022).

206. Tenk, C. M., Kavaliers, M. & Ossenkopp, K.-P. Neonatal treatment with lipopolysaccharide differentially affects adult anxiety responses in the light-dark test and taste neophobia test in male and female rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* **31**, 171–180 (2013).

207. Claypoole, L. D., Zimmerberg, B. & Williamson, L. L. Neonatal lipopolysaccharide treatment alters hippocampal neuroinflammation, microglia morphology and anxiety-like

behavior in rats selectively bred for an infantile trait. *Brain Behav. Immun.* **59**, 135–146 (2017).

208. Berkiks, I. *i in*. Postnatal melatonin treatment protects against affective disorders induced by early-life immune stimulation by reducing the microglia cell activation and oxidative stress. *Int. J. Neurosci.* **128**, 495–504 (2018).

209. Sominsky, L. *i in*. Functional programming of the autonomic nervous system by early life immune exposure: implications for anxiety. *PLoS One* **8**, e57700 (2013).

210. Custódio, C. S. *i in*. Neonatal Immune Challenge with Lipopolysaccharide Triggers Long-lasting Sex- and Age-related Behavioral and Immune/Neurotrophic Alterations in Mice: Relevance to Autism Spectrum Disorders. *Mol. Neurobiol.* **55**, 3775–3788 (2018).

211. Saavedra, L. M., Hernández-Velázquez, M. G., Madrigal, S., Ochoa-Zarzosa, A. & Torner, L. Long-term activation of hippocampal glial cells and altered emotional behavior in male and female adult rats after different neonatal stressors. *Psychoneuroendocrinology* **126**, 105164 (2021).

212. Okano, H. *i in*. Ameliorating effect of continuous alpha-glycosyl isoquercitrin treatment starting from late gestation in a rat autism model induced by postnatal injection of lipopolysaccharides. *Chem. Biol. Interact.* **351**, 109767 (2022).

213. Doenni, V. M. *i in*. Deficient adolescent social behavior following early-life inflammation is ameliorated by augmentation of anandamide signaling. *Brain Behav. Immun.* **58**, 237–247 (2016).

214. Doenni, V. M., Song, C. M., Hill, M. N. & Pittman, Q. J. Early-life inflammation with LPS delays fear extinction in adult rodents. *Brain Behav. Immun.* **63**, 176–185 (2017).

215. Brust, V., Schindler, P. M. & Lewejohann, L. Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). *Front. Zool.* **12 Suppl 1**, S17 (2015).

216. Kavaliers, M., Matta, R. & Choleris, E. Mate-choice copying, social information processing, and the roles of oxytocin. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **72**, 232–242 (2017).
217. Łopucki, R. & Szymroszczyk, P. Recognition of interspecific familiar versus unfamiliar odours among bank voles and yellow-necked mice. *Acta Theriol. (Warsz.)* **48**, 167–176 (2003).
218. Schellinck, H. M., Price, S. R. & Wong, M. J. Using ethologically relevant tasks to study olfactory discrimination in rodents. w *Chemical Signals in Vertebrates 11* 71–80 (Springer New York, New York, NY, 2007).
219. Ardalan, M. *i in*. Reelin cells and sex-dependent synaptopathology in autism following postnatal immune activation. *Br. J. Pharmacol.* **179**, 4400–4422 (2022).
220. MacRae, M., Macrina, T., Khoury, A., Migliore, M. M. & Kentner, A. C. Tracing the trajectory of behavioral impairments and oxidative stress in an animal model of neonatal inflammation. *Neuroscience* **298**, 455–466 (2015).
221. Zhu, F. *i in*. Minocycline and risperidone prevent microglia activation and rescue behavioral deficits induced by neonatal intrahippocampal injection of lipopolysaccharide in rats. *PLoS One* **9**, e93966 (2014).
222. Sylvia, K. E., Báez Ramos, P. & Demas, G. E. Sickness-induced changes in physiology do not affect fecundity or same-sex behavior. *Physiol. Behav.* **184**, 68–77 (2018).
223. Tsao, C.-H., Wu, K.-Y., Su, N. C., Edwards, A. & Huang, G.-J. The influence of sex difference on behavior and adult hippocampal neurogenesis in C57BL/6 mice. *Sci. Rep.* **13**, 17297 (2023).
224. Knoedler, J. R. *i in*. A functional cellular framework for sex and estrous cycle-dependent gene expression and behavior. *Cell* **185**, 654-671.e22 (2022).

225. Skoglund, C. *i in.* Time after time: failure to identify and support females with ADHD - a Swedish population register study. *J. Child Psychol. Psychiatry* **65**, 832–844 (2024).
226. Juskewitch, J. E. *i in.* LPS-induced murine systemic inflammation is driven by parenchymal cell activation and exclusively predicted by early MCP-1 plasma levels. *Am. J. Pathol.* **180**, 32–40 (2012).
227. Zhang, D. *i in.* Severe inflammation in new-borns induces long-term cognitive impairment by activation of IL-1 β /KCC2 signaling during early development. *BMC Med.* **20**, 235 (2022).
228. Saavedra, L. M., Fenton Navarro, B. & Torner, L. Early Life Stress Activates Glial Cells in the Hippocampus but Attenuates Cytokine Secretion in Response to an Immune Challenge in Rat Pups. *Neuroimmunomodulation* **24**, 242–255 (2017).
229. Yeh, J.-H. *i in.* Pioglitazone Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Behavioral Impairment, Brain Inflammation, White Matter Injury and Mitochondrial Dysfunction in Neonatal Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
230. Astori, M., Finke, D., Karapetian, O. & Acha-Orbea, H. Development of T-B cell collaboration in neonatal mice. *Int. Immunol.* **11**, 445–451 (1999).
231. McGrath-Morrow, S. A. *i in.* Immune response to intrapharyngeal LPS in neonatal and juvenile mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **52**, 323–331 (2015).
232. Landreth, K. S. Critical windows in development of the rodent immune system. *Hum. Exp. Toxicol.* **21**, 493–498 (2002).
233. Sedney, C. J. & Harvill, E. T. The neonatal immune system and respiratory pathogens. *Microorganisms* **11**, (2023).
234. Lee, H.-H. *i in.* Delayed maturation of an IL-12-producing dendritic cell subset explains the early Th2 bias in neonatal immunity. *J. Exp. Med.* **205**, 2269–2280 (2008).

235. Lau, A. S., Sigaroudinia, M., Yeung, M. C. & Kohl, S. Interleukin-12 induces interferon-gamma expression and natural killer cytotoxicity in cord blood mononuclear cells. *Pediatr. Res.* **39**, 150–155 (1996).
236. Kaminski, B. A. *i in*. Reduced expression of NFAT-associated genes in UCB versus adult CD4⁺ T lymphocytes during primary stimulation. *Blood* **102**, 4608–4617 (2003).
237. Wang, X. *i in*. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on morphological and motor outcomes after traumatic brain injury. *J. Neurosci.* **20**, 7037–7042 (2000).
238. Lim, G. P., Russell, M. J., Cullen, M. J. & Tökés, Z. A. Matrix metalloproteinases in dog brains exhibiting Alzheimer-like characteristics. *J. Neurochem.* **68**, 1606–1611 (1997).
239. Hedley, K. E. *i in*. The medulla oblongata shows a sex-specific inflammatory response to systemic neonatal lipopolysaccharide. *J. Neuroimmunol.* **389**, 578316 (2024).
240. Sathyanesan, A. *i in*. Emerging connections between cerebellar development, behaviour and complex brain disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **20**, 298–313 (2019).
241. Beckinghausen, J. & Sillitoe, R. V. Insights into cerebellar development and connectivity. *Neurosci. Lett.* **688**, 2–13 (2019).
242. Banks, W. A., Kastin, A. J. & Gutierrez, E. G. Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci. Lett.* **179**, 53–56 (1994).
243. Galea, I. The blood-brain barrier in systemic infection and inflammation. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 2489–2501 (2021).
244. Bell, M. R. Comparing postnatal development of gonadal hormones and associated social behaviors in rats, mice, and humans. *Endocrinology* **159**, 2596–2613 (2018).
245. Prevot, V. Puberty in Mice and Rats. w *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 1395–1439 (Elsevier, 2015).

246. Corbier, P., Edwards, D. A. & Roffi, J. The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* **100**, 127–131 (1992).
247. Poling, M. C. & Kauffman, A. S. Sexually dimorphic testosterone secretion in prenatal and neonatal mice is independent of kisspeptin-Kiss1r and GnRH signaling. *Endocrinology* **153**, 782–793 (2012).
248. Mannan, M. A. & O'Shaughnessy, P. J. Ovarian steroid metabolism during post-natal development in the normal mouse and in the adult hypogonadal (hpg) mouse. *J. Reprod. Fertil.* **82**, 727–734 (1988).
249. Meng, Q. *i in*. Activation of estrogen receptor α inhibits TLR4 signaling in macrophages and alleviates the instability of atherosclerotic plaques in the postmenopausal stage. *Int. Immunopharmacol.* **116**, 109825 (2023).
250. Kosyreva, A. M. *i in*. Sex differences of inflammatory and immune response in pups of Wistar rats with SIRS. *Sci. Rep.* **10**, 15884 (2020).
251. Crabbe, J. C., Wahlsten, D. & Dudek, B. C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* **284**, 1670–1672 (1999).
252. Lucchina, L., Carola, V., Pitossi, F. & Depino, A. M. Evaluating the interaction between early postnatal inflammation and maternal care in the programming of adult anxiety and depression-related behaviors. *Behav. Brain Res.* **213**, 56–65 (2010).
253. Liu, D. *i in*. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* **277**, 1659–1662 (1997).
254. Majcher-Maślanka, I., Solarz, A. & Chocyk, A. Maternal separation disturbs postnatal development of the medial prefrontal cortex and affects the number of neurons and glial cells in adolescent rats. *Neuroscience* **423**, 131–147 (2019).

255. Macrí, S., Mason, G. J. & Würbel, H. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 1017–1024 (2004).
256. Sominsky, L. *i in*. Neonatal immune challenge alters reproductive development in the female rat. *Horm. Behav.* **62**, 345–355 (2012).
257. Vafadari, B., Mitra, S., Stefaniuk, M. & Kaczmarek, L. Psychosocial Stress Induces Schizophrenia-Like Behavior in Mice With Reduced MMP-9 Activity. *Front. Behav. Neurosci.* **13**, 195 (2019).
258. van den Berg, W. E., Lamballais, S. & Kushner, S. A. Sex-specific mechanism of social hierarchy in mice. *Neuropsychopharmacology* **40**, 1364–1372 (2015).
259. Apps, M. A. J., Rushworth, M. F. S. & Chang, S. W. C. The anterior cingulate gyrus and social cognition: Tracking the motivation of others. *Neuron* **90**, 692–707 (2016).
260. Mohapatra, A. N. & Wagner, S. The role of the prefrontal cortex in social interactions of animal models and the implications for autism spectrum disorder. *Front. Psychiatry* **14**, 1205199 (2023).
261. Kuga, N., Abe, R., Takano, K., Ikegaya, Y. & Sasaki, T. Prefrontal-amygdalar oscillations related to social behavior in mice. *Elife* **11**, (2022).
262. Simon, J., Iv & Rich, E. L. Neural populations in macaque anterior cingulate cortex encode social image identities. *Nat. Commun.* **15**, 7500 (2024).
263. Guo, B. *i in*. Anterior cingulate cortex dysfunction underlies social deficits in Shank3 mutant mice. *Nat. Neurosci.* **22**, 1223–1234 (2019).
264. Laroui, A. *i in*. Clinical significance of matrix metalloproteinase-9 in Fragile X Syndrome. *Sci. Rep.* **12**, 15386 (2022).
265. Razak, K. A., Binder, D. K. & Ethell, I. M. Neural Correlates of Auditory Hypersensitivity in Fragile X Syndrome. *Front. Psychiatry* **12**, 720752 (2021).

266. Spencer, C. M., Alekseyenko, O., Serysheva, E., Yuva-Paylor, L. A. & Paylor, R. Altered anxiety-related and social behaviors in the *Fmr1* knockout mouse model of fragile X syndrome. *Genes Brain Behav.* **4**, 420–430 (2005).
267. McCarthy, D. M. *i in*. Behavioral, neurotransmitter and transcriptomic analyses in male and female *Fmr1* KO mice. *Front. Behav. Neurosci.* **18**, 1458502 (2024).
268. Dansie, L. E. *i in*. Long-lasting effects of minocycline on behavior in young but not adult Fragile X mice. *Neuroscience* **246**, 186–198 (2013).
269. Lovelace, J. W., Ethell, I. M., Binder, D. K. & Razak, K. A. Minocycline Treatment Reverses Sound Evoked EEG Abnormalities in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Front. Neurosci.* **14**, 771 (2020).
270. Winiarski, M. *i in*. Information sharing within a social network is key to behavioral flexibility—Lessons from mice tested under seminaturalistic conditions. *Sci. Adv.* **11**, (2025).
271. Dal-Pizzol, F. *i in*. Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis. *Mol. Neurobiol.* **48**, 62–70 (2013).
272. Ahmadighadykolaie, H., Lambert, J. A. & Raeesazadeh-Sarmazdeh, M. TIMP-1 protects tight junctions of brain endothelial cells from MMP-mediated degradation. *Pharm. Res.* **40**, 2121–2131 (2023).
273. Ubogu, E. E., Callahan, M. K., Tucky, B. H. & Ransohoff, R. M. Determinants of CCL5-driven mononuclear cell migration across the blood-brain barrier. Implications for therapeutically modulating neuroinflammation. *J. Neuroimmunol.* **179**, 132–144 (2006).
274. Zhou, S. *i in*. CCL5 mediated astrocyte-T cell interaction disrupts blood-brain barrier in mice after hemorrhagic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **44**, 367–383 (2024).

275. Lin, J. *i in*. CCL5/CCR5-mediated peripheral inflammation exacerbates blood–brain barrier disruption after intracerebral hemorrhage in mice. *J. Transl. Med.* **21**, 196 (2023).
276. Sun, Z.-W. *i in*. Blood-brain barrier dysfunction mediated by the EZH2-Claudin-5 axis drives stress-induced TNF- α infiltration and depression-like behaviors. *Brain Behav. Immun.* **115**, 143–156 (2024).
277. Barichello, T., Generoso, J. S., Collodel, A., Petronilho, F. & Dal-Pizzol, F. The blood-brain barrier dysfunction in sepsis. *Tissue Barriers* **9**, 1840912 (2021).
278. Liebner, S. *i in*. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol.* **135**, 311–336 (2018).
279. Moretti, R. *i in*. Blood-brain barrier dysfunction in disorders of the developing brain. *Front. Neurosci.* **9**, 40 (2015).
280. Logsdon, A. F. *i in*. Inter-alpha inhibitor proteins attenuate lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption in neonatal mice. *Exp. Neurol.* **370**, 114563 (2023).
281. Wang, P. *i in*. Systemic injection of low-dose lipopolysaccharide fails to break down the blood-brain barrier or activate the TLR4-MyD88 pathway in neonatal rat brain. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 10101–10115 (2014).
282. Savarin, C. *i in*. MMP9 deficiency does not decrease blood-brain barrier disruption, but increases astrocyte MMP3 expression during viral encephalomyelitis. *Glia* **59**, 1770–1781 (2011).
283. Spiteri, A. G., Wishart, C. L., Pamphlett, R., Locatelli, G. & King, N. J. C. Microglia and monocytes in inflammatory CNS disease: integrating phenotype and function. *Acta Neuropathol.* **143**, 179–224 (2022).

284. Chabot, V. *i in*. CCL5-enhanced human immature dendritic cell migration through the basement membrane in vitro depends on matrix metalloproteinase-9. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 767–778 (2006).
285. Benakis, C., Garcia-Bonilla, L., Iadecola, C. & Anrather, J. The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 461 (2014).
286. Wattananit, S. *i in*. Monocyte-derived macrophages contribute to spontaneous long-term functional recovery after stroke in mice. *J. Neurosci.* **36**, 4182–4195 (2016).
287. Andoh, M. & Koyama, R. Comparative Review of Microglia and Monocytes in CNS Phagocytosis. *Cells* **10**, (2021).
288. Cronk, J. C. *i in*. Peripherally derived macrophages can engraft the brain independent of irradiation and maintain an identity distinct from microglia. *J. Exp. Med.* **215**, 1627–1647 (2018).
289. Lan, K.-M., Tien, L.-T., Pang, Y., Bhatt, A. J. & Fan, L.-W. IL-1 receptor antagonist attenuates neonatal lipopolysaccharide-induced long-lasting learning impairment and hippocampal injury in adult rats. *Toxicol. Lett.* **234**, 30–39 (2015).
290. Waddell, J. *i in*. Early postnatal neuroinflammation produces key features of diffuse brain white matter injury in rats. *Brain Sci.* **14**, 976 (2024).
291. Leone, C. *i in*. Characterization of human monocyte-derived microglia-like cells. *Glia* **54**, 183–192 (2006).
292. Faust, T. E., Gunner, G. & Schafer, D. P. Mechanisms governing activity-dependent synaptic pruning in the developing mammalian CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **22**, 657–673 (2021).

8. Publikacje własne doktorantki

- Protokowicz K., Ptaszek K., Jurkowlaniec E. (2019). Budowa i funkcje jąder szwu, Nauki medyczne i nauki o zdrowiu. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy, pod red. Nyćkowiak J., Leśny J., p. 133–138.
- Dzirkale, Z., Pilipenko, V., Pijet, B., Klimaviciusa, L., Upite, J., Protokowicz, K., Kaczmarek, L., & Jansone, B. (2023). Long-term behavioural alterations in mice following transient cerebral ischemia. Behavioural Brain Research, 452, 114589. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114589>
- Kaczmarek, K. T.*, Protokowicz, K.*, & Kaczmarek, L. (2023). Matrix metalloproteinase-9: A magic drug target in neuropsychiatry? Journal of Neurochemistry. <https://doi.org/10.1111/jnc.15976>; * równorzędny pierwszy autor