

Mgr Aleksandra Zawadzka

**Wpływ aktywacji układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży
na funkcję i strukturę mitochondriów w mózgu potomstwa
w zwierzęcym modelu zaburzeń ze spektrum autyzmu**

Rozprawa na stopień naukowy doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. Agata Adamczyk

Promotor pomocniczy: dr Magdalena Cieślik



Polska Akademia Nauk

Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora
w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2023

*Składam serdeczne podziękowania promotorowi mojej pracy
Prof. dr hab. Agacie Adamczyk
Za możliwość realizowania pracy pod jej opieką,
Cenne wskazówki i uwagi,
Oraz niezliczone godziny poświęcone, by praca ta mogła powstać.*

*Pragnę podziękować dr Magdalenie Cieślik
Za pomoc i wsparcie, zarówno w laboratorium jak i poza nim,
Niesłabnący entuzjazm i wiarę w sukces,
Oraz przekazaną wiedzę.*

*Serdecznie dziękuję wszystkim Współpracownikom
Z Zakładu Komórkowej Transdukcji Sygnału,
Za nieocenioną pomoc w realizacji badań.
Szczególnie dziękuję Lidii, Marcie oraz Eli,
Za wsparcie, troskę i zrozumienie.*

*Dziękuję moim Rodzicom,
Których praca naukowa była dla mnie inspiracją,
A niezachwiana wiara w moje możliwości -
motywacją do ukończenia tej pracy*

*Największe podziękowania składam mojemu Mężowi,
Którego wiara we mnie, cierpliwość i gotowość do pomocy
Umożliwiły mi realizację badań i ukończenie tej pracy.
I mojej Córce, za to, że jest.*

Wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w pracach:

1. Cieřlik, M.*; **Zawadzka, A.***; Czapski, G.A.; Wilkaniec, A.; Adamczyk, A. Developmental Stage-Dependent Changes in Mitochondrial Function in the Brain of Offspring Following Prenatal Maternal Immune Activation. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 7243 (IF = 6,208)
*- pierwszy autor r3wnorzędnym
2. Cieřlik, M.; Gassowska-Dobrowolska, M.; **Zawadzka, A.**; Frontczak-Baniewicz, M.; Gewartowska, M.; Dominiak, A.; Czapski, G.A.; Adamczyk, A. The Synaptic Dysregulation in Adolescent Rats Exposed to Maternal Immune Activation. *Front. Mol. Neurosci.* 2020, 13, 555290 (IF = ,6,261)
3. Cieřlik, M.; Gassowska-Dobrowolska, M.; Jęřko, H.; Czapski, G.A.; Wilkaniec, A.; **Zawadzka, A.**; Dominiak, A.; Polowy, R.; Filipkowski, R.K.; Boguszewski, P.M.; Gewartowska, M.; Frontczak-Baniewicz, M.; Sun, G.Y.; Beversdorf, D.Q.; Adamczyk, A. Maternal Immune Activation Induces Neuroinflammation and Cortical Synaptic Deficits in the Adolescent Rat Offspring. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 4097. (IF = 5,924)
4. **Zawadzka, A.**; Cieřlik, 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.* 2021, 22, 11516 (praca przeglądowna) (IF = 6,208)

**Wyniki prac prezentowane byly w formie licznych komunikatów
na konferencjach krajowych i zagranicznych**

Autorka uzyskała środki finansowe w ramach:

Interdyscyplinarne, stacjonarne studia doktoranckie

Rozwój i wykorzystanie metod bioinżynieryjnych i informatycznych w prewencji,
diagnostyce i terapii chorób cywilizacyjnych - kompleksowy rozwój kompetencji
zawodowych młodej kadry naukowej Och!DOK

**Badania w niniejszej pracy finansowano
z projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki:**

nr 2016/23/D/NZ4/03572

Spis treści

1.	Wykaz skrótów	11
2.	Streszczenie w języku polskim	17
3.	Streszczenie w języku angielskim	20
4.	Innowacyjność rozprawy	23
5.	Wykaz rycin	24
6.	Wykaz tabel	27
7.	Wstęp	28
7.1.	Zaburzenia ze spektrum autyzmu	28
7.1.1.	Obraz kliniczny zaburzeń ze spektrum autyzmu.....	28
7.1.2.	Diagnostyka i klasyfikacja zaburzeń ze spektrum autyzmu	29
7.1.3.	Epidemiologia zaburzeń ze spektrum autyzmu.....	30
7.1.4.	Etiologia zaburzeń ze spektrum autyzmu	32
7.2.	Zwierzęce modele autyzmu	34
7.3.	Funkcjonowanie układu odpornościowego w ciąży	38
7.3.1.	Znaczenie cytokin w rozwoju i utrzymaniu ciąży.....	38
7.3.2.	Cytokiny w warunkach infekcji. Znaczenie w przebiegu ciąży i w rozwoju płodu.....	40
7.4.	Rola mikrogleju w zaburzeniach neurorozwojowych indukowanych aktywacją układu odpornościowego matki w ciąży.....	47
7.5.	Stres oksydacyjny w autyzmie i w zwierzęcych modelach chorób neurorozwojowych	49
7.6.	Funkcjonowanie mitochondriów w ośrodkowym układzie nerwowym	52
7.6.1.	Udział mitochondriów w generacji wolnych rodników tlenowych	52
7.6.2.	Dynamika mitochondriów.....	55
7.6.3.	Mitofagia i biogeneza mitochondriów	57
7.6.4.	Mitochondria w zaburzeniach ze spektrum autyzmu	60
8.	Założenia i cel pracy	62
9.	Materiały i metody	64
9.1.	Zwierzęta doświadczalne i model aktywacji układu odpornościowego matki w ciąży (MIA)	64

9.1.1.	Zwierzęta doświadczalne	64
9.1.2.	Model MIA	65
9.1.3.	Eutanazja zwierząt i izolacja struktur mózgu	66
9.2.	Izolacja mitochondriów	66
9.3.	Analiza poziomu ekspresji genów	66
9.3.1.	Izolacja RNA.....	66
9.3.2.	Odwrotna transkrypcja	67
9.3.3.	Analiza ilościowa ekspresji mRNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym.....	67
9.4.	Metody spektrofotometryczne	70
9.4.1.	Oznaczanie poziomu białka	70
9.4.2.	Pomiar aktywności oksydazy NADPH (NOX).....	70
9.4.3.	Analiza poziomu glutationu	71
9.4.4.	Pomiar aktywności kompleksów mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów.....	71
9.4.5.	Pomiar aktywności syntazy cytrynianowej.....	73
9.5.	Metody immunochemiczne.....	74
9.5.1.	Immunochemiczna detekcja białek metodą Western blot.....	74
9.5.2.	Immunochemiczna analiza poziomu cytokin w surowicy krwi metodą Luminex... ..	79
9.6.1.	Analiza mitochondrialnego potencjału błonowego.....	79
9.6.2.	Pomiar poziomu wolnych rodników tlenowych przy użyciu sondy H ₂ DCF-DA... ..	80
9.6.3.	Pomiar anionorodnika ponadtlenkowego przy użyciu dihydroetydyny	80
9.7.1.	Pomiar poziomu mitochondrialnego ATP	80
9.8.	Metody mikroskopowe	81
9.8.1.	Analiza immunohistochemiczna z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej ..	81
9.8.2.	Analiza ultrastruktury mitochondriów z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej	82
9.9.	Testy behawioralne	82
9.9.1.	Test otwartego pola.....	82
9.9.2.	Trójkomorowy test socjalizacji.....	83
9.9.3.	Test izolacji od matki	84
9.9.4.	Test preferencji ściółki.....	85

9.10.	Analiza statystyczna otrzymanych wyników	85
10.	Wyniki.....	86
10.1.	Aktywacja układu odpornościowego matki oraz jej wpływ na ekspresję cytokin prozapalnych w tkance płodowej oraz w łożysku.....	86
10.1.1.	Model matczynej aktywacji układu odpornościowego	86
10.1.2.	Wpływ MIA na ekspresję cytokin prozapalnych w tkance płodowej oraz w łożysku	88
10.1.3.	Wpływ MIA na stres oksydacyjny oraz funkcje mitochondriów w tkance płodowej.....	91
10.2.	Wpływ MIA na związane z autyzmem zachowania zwierząt potomnych	94
10.2.1.	Zaburzenia behawioralne u osesków.....	95
10.2.2.	Zaburzenia behawioralne u młodego potomstwa.....	96
10.3.	Wpływ MIA na rozwój procesów prozapalnych oraz stres oksydacyjny w mózgu osesków	99
10.3.1.	Ekspresja wybranych cytokin prozapalnych	99
10.3.2.	Markery stresu oksydacyjnego.....	99
10.4.	Wpływ MIA na stan mitochondriów w mózgu osesków	103
10.4.1.	Funkcjonowanie mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów	103
10.4.2.	Dynamika, biogeneza oraz autofagia mitochondriów.....	105
10.4.2.2.	Biogeneza i selektywna autofagia mitochondriów	110
10.5.	Wpływ MIA na aktywację procesów prozapalnych oraz stresu oksydacyjnego w mózgu młodych zwierząt potomnych	113
10.5.1.	Ekspresja cytokin prozapalnych i aktywacja mikrogleju.....	113
10.5.2.	Poziom cytokin prozapalnych w surowicy	118
10.6.	Wpływ MIA na poziom reaktywnych form tlenu oraz markery stresu oksydacyjnego w mózgu młodych zwierząt potomnych	120
10.7.	Wpływ MIA na funkcjonowanie mitochondriów w mózgu młodych zwierząt potomnych.....	126
10.7.1.	Zaburzenia mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów	126
10.7.2.	Zmiany białek regulujących fuzję i fragmentację mitochondriów.....	129
10.7.3.	Analiza białek regulujących mitofagię i biogenezę mitochondriów	136
10.7.4.	Zaburzenia ultrastruktury mitochondriów.....	140

11. Dyskusja	144
11.1. Zależne od pobudzenia układu odpornościowego matki zmiany w tkance płodowej.	145
11.2. Zmiany behawioralne u potomstwa MIA na różnych etapach życia	149
11.3. Zaburzenia molekularne w mózgu osesków narażonych na działanie MIA	153
11.4. Patologiczne zmiany w mózgu młodego potomstwa po prenatalnej ekspozycji na MIA	156
11.5. Podsumowanie.....	165
12. Wnioski	167
13. Spis piśmiennictwa	168

1. Wykaz skrótów

3-CT - 3-chloro-l-tyrozyna

3-NT - 3-nitrotyrozyna

8-oxo-dG - 8-okso-2'-deoksyguanozyna

Actb - β -aktyna

ADI-R - poprawiony wywiad do diagnozowania autyzmu, ang. Autism Diagnostic Interview – Revised

ADOS-2 - protokół obserwacji do diagnozowania zaburzeń ze spektrum autyzmu druga edycja, ang. Autism Diagnostic Observation Schedule, Second Edition

ADP - adenozyjno-5'-difosforan

AGM - ang. aorta-gonad mesonephros

APP - Amerykańska Akademia Pediatrii

ARE - element odpowiedzi antyoksydacyjnej, ang. antioxidant response element

Arg-1 - arginaza 1

ASD - zaburzenia ze spektrum autyzmu, ang. autism spectrum disorders

ATPaza - adenylozotryfosfataza

BBB - bariera krew-mózg, ang. blood-brain barrier

BOSA - ang. The Brief Observation of Symptoms of Autism

BSA - surowicza albumina bydlęca, ang. bovine serum albumin

CAT - katalaza, ang. catalase

CD14 - ang. cluster of differentiation 14

CDC - ang. Center for Disease Control and Prevention

cDNA - komplementarne DNA, ang. complementary DNA

CHD8 - ang. chromodomain helicase DNA-binding protein 8

CMV - wirus cytomegalii, ang. Cytomegalovirus

CoA - koenzym-A

CoQ - koenzym Q

COVID-19 - choroba powodowana przez wirus SARS-CoV-2, ang. coronavirus disease 2019

COX-2 - cyklooksygenaza-2

CSF1 - czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytarnych, ang. colony-stimulating factor 1

Cyt c - cytochrom c

DAMPs - wzorce molekularne związane z uszkodzeniem, ang. damage-associated molecular patterns

DAPI - 4',6-diamidyno-2-fenylindol

DC - komórki dendrytyczne, ang. dendritic cells

DCF - 2',7'-dichlorofluoresceina

DCPIP - ang. 2,6-dichlorophenolindophenol

DHE - dihydroetydyna, ang. dihydroethidium

DMSO - dimetylosulfotlenek

Drp1 - ang. dynamin-related protein 1

DSM-5 - ang. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – version 5

dsRNA - dwuniciowy kwas rybonukleinowy, ang. double-stranded ribonucleic acid

DTNB - kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy), odczynnik Ellmana

DTT - ditiotreitol

DUOX1 - dioksygenaza 1, ang. dual oxidase 1

DYRK1A - ang. dual-specificity tyrosine- (Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A

EDTA - kwas wersenowy, ang. ethylenediaminetetraacetic acid

EKSMOoN - Elektroniczny Krajowy System Monitoringu Orzekania o Niepełnosprawności

FAD - dinukleotyd flawinoadeninowy

Fis1 - ang. mitochondrial fission protein 1

FMR1 - ang. fragile X mental retardation 1

FXS - zespół łamliwego chromosomu X, ang. fragile X syndrome

GAPDH - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GDAP1 - ang. ganglioside induced differentiation associated protein 1

GDP - difosforan guanozyny

GH - hormon wzrostu, ang. growth hormone

gp130 - glikoproteina 130

GPxs - peroksydazy glutationowe, ang. glutathione peroxidases

GR - reduktaza glutationowa, ang. glutathione reductase

GSH - forma zredukowana glutationu

GSSG - forma utleniona, disulfid glutationu, ang. GSH disulfide

GTP - trifosforan guanozyny

GTPaza - hydrolaza GTP

H₂DCF - – 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina

H₂DCF-DA - dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny

H₂O₂ - nadtlenek wodoru

HE - 2-hydroksyetydyna

HEPES - kwas hydroksyetylopiperazynoetanosulfonowy, ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HRP - peroksydaza chrzanowa, ang. horseradish peroxidase

ICD-11 - Międzynarodowa Statystyczna Klasyfikacja Chorób i Problemów Zdrowotnych, ang. International Classification of Diseases – version 11

IFN - interferon

IGF-1 - insulinopodobny czynnik wzrostu 1, ang. insulin-like growth factor 1

IL - interleukina

IL-1Ra - antagonist receptora dla IL-1, ang. IL-1 receptor antagonist

IL-6R - receptor dla IL-6, ang. Interleukin 6 receptor

IMM - wewnętrzna błona mitochondrialna, ang. inner-mitochondrial membrane

ITC - ang. Infant Toddler Checklist

JAK - kinazy janusowe, ang. Janus kinase

JC-1 - jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazokarbocyaniny

Keap1 - ang. kelch like ECH associated protein 1

KO - unieczynnienie genu, ang. knock-out

LBP - ang. LPS-binding protein

LC3 - ang. microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

LIF - czynnik hamujący białaczkę, ang. leukemia inhibitory factor

L-Opal - forma długa Opa1, ang. long-Opa1

LOX - lipoksygenaza

LPS - lipopolisacharyd

Maf - ang. musculoaponeurotic fibrosarcoma

MAO - monoaminooksydaza

MAPK - kinazy aktywowane mitogenami, ang. mitogen-activated protein kinases

M-CHAT - ang. Modified Checklist for Autism in Toddlers

MD - choroby mitochondrialne, ang. classic mitochondrial disease

MD-2 - ang. myeloid differentiation factor 2

MDA - dialdehyd malonowy, ang. malondialdehyde

MES - kwas 2-(N-morfolino)-etanosulfonowy

Mff - ang. mitochondrial fission factor

Mfn1 - mitofuzyna 1

Mfn2 - mitofuzyna 2

MIA - aktywacja układu odpornościowego matki, ang. maternal immune activation

MOC - ang. Mander's overlap coefficient

MPO - mieloperoksydaza

mRNA - matrycowy RNA, ang. messenger RNA

mtDNA - mitochondrialny DNA

mTOR - ssaczy cel rapamycyny, ang. mammalian target of rapamycin kinase

MyD88 - ang. myeloid differentiation primary response 88

NADH - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NDS - surowica ośła, ang. Normal Donkey Serum

NF- κ B - jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B, ang. the nuclear factor kappa B

NLRP3 - białko NOD-podobne 3, zawierające domenę pirynową, ang. NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NO - tlenek azotu

NOS - syntaza tlenku azotu

NOX - oksydaza NADPH

NRF1 i NRF2 - ang. nuclear respiratory factor 1 i 2

Nrf2 - ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2

NSC - neuronalne komórki macierzyste, ang. neural stem cells

O₂⁻ - anionorodnik ponadtlenkowy

OMM - zewnętrzna błona mitochondrialna, ang. outer-mitochondrial membrane

ONOO⁻ - nadtlenoazotyn

Opa1 - ang. optic atrophy 1

OUN - ośrodkowy układ nerwowy

PAMPs - molekularne wzorce związane z patogenami, ang. pathogen-associated molecular patterns

PARL - ang. presenilin-associated rhomboid-like protein

PBMCs - jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, ang. peripheral blood mononuclear cells

PBS - buforowany roztwór soli fizjologicznej, ang. phosphate-buffered saline

PGC1 α - koaktywator-1 α receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksysomów, ang. the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α

PINK1 - ang. PTEN-induced kinase 1

poli(I:C) - kwas poliinozynowy-policytydylowy, ang. polyinosinic:polycytidylic acid

PPA - kwas propionowy, ang. propionic acid

PRR - receptory rozpoznające wzorce, ang. pattern recognition receptors

qRT-PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym, ang. quantitative real-time PCR

R.T. - temperatura pokojowa, ang. room temperature

RFA - reaktywne formy azotu

RFT - reaktywne formy tlenu

ROR γ t - jądrowy receptor sierocy, ang. retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t

SB - bufor obciążający, ang. Sample Buffer Laemmli

SCN2A - ang. sodium voltage-gated channel alpha subunit 2

SDS- laurylosiarczan sodu, ang. sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE - rozdział elektroforetyczny białek, ang. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

-SH - grupy sulfhydrylowe

sIL-6R - rozpuszczalna forma IL-6R, ang. soluble IL-6R

SIO - System Informacji Oświatowej

SODs - dysmutazy ponadtlenkowe, ang. superoxide dismutases

S-Opa1 - forma krótka Opa1, ang. short-Opa1

STAT - ang. Screening Tool for Autism in Two-Year-Olds

STAT3 - ang. signal transducer and activator of transcription 3

TBS-T - ang. tris buffered saline with tween

TEM - transmisyjny mikroskop elektronowy

Tfam - transkrypcyjny czynnik mitochondrialny A, ang. mitochondrial transcription factor A

TGF β - transformujący czynnik wzrostu β , ang. transforming growth factor β

TLR - ang. toll-like receptor

TNFR1 - receptor dla TNF- α

TNF- α - czynnik martwicy nowotworów, ang. tumor necrosis factor α

TRIF - ang. TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

TrxR - reduktaza tioredoksyny ang. thioredoxin reductase

TSC - stwardnienie guzowate, ang. tuberous sclerosis complex

UCP - białka rozprzegające, ang. uncoupling proteins

uNK - maciczne komórki NK, ang. uterine natural killer

USV - wokalizacje ultradźwiękowe, ang. ultrasonic vocalizations

VPA - kwas walproinowy, ang. valproic acid

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia, ang. World Health Organization

WR - odczynnik reakcyjny, ang. working reagent

$\Delta\Psi_m$ – potencjał mitochondrialny

•OH - rodnik hydroksylowy

1O_2 - tlen singletowy

2. Streszczenie w języku polskim

Zaburzenia ze spektrum autyzmu (ang. autism spectrum disorders, ASD) to różnorodna grupa zaburzeń o podłożu neurorozwojowym, charakteryzujących się trudnościami w nawiązywaniu relacji społecznych i komunikacji społecznej, jak również obecnością sztywnych, stereotypowych wzorców zachowań. ASD dotyka około 1% populacji dziecięcej na świecie, a ilość diagnozowanych przypadków stale rośnie. Badania ostatnich lat przyczyniły się do sformułowania obecnie dominującej teorii, iż wystąpienie ASD u dziecka jest wynikiem połączenia podatności genetycznej pacjenta i wpływu czynników środowiskowych. Wśród tych ostatnich duży nacisk kładzie się na stres prenatalny, a w szczególności stres wywołany aktywacją układu odpornościowego matki w ciąży (ang. maternal immune activation, MIA). Badania epidemiologiczne wykazały powiązanie między infekcją matki w trakcie ciąży a zwiększonym ryzykiem wystąpienia chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o podłożu neurorozwojowym u potomstwa, w tym ASD. Wykazano także, iż zwierzęta prenatalnie poddane działaniu MIA wykazują ASD-podobne zaburzenia behawioralne. Do chwili obecnej nie istnieją jednak kompleksowe badania dotyczące stanu mitochondriów w mózgu potomstwa MIA, choć zaburzenia mitochondrialne są coraz częściej diagnozowane u pacjentów z autyzmem. Mając na uwadze powyższe, a także kluczowe znaczenie wydajności mitochondriów dla prawidłowego funkcjonowania mózgu nie tylko w życiu płodowym, ale i w późniejszych etapach rozwoju, celem badań była weryfikacja hipotezy, iż w zaburzeniach ze spektrum autyzmu wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży dochodzi do nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów i zaburzeń metabolizmu energetycznego w mózgu. W niniejszej pracy wykorzystano model MIA indukowany podaniem lipopolisacharydu (LPS, 100 µg/kg m.c) ciężarnej samicy stada Wistar w 9,5 dniu ciąży. Badania prowadzono na mózgach potomstwa w oparciu o metody immunochemiczne, luminescencyjne, spektrofotometryczne, spektrofluorymetryczne oraz mikroskopowe. Analizowano również typowe dla autyzmu zaburzenia zachowań stosując odpowiednie testy behawioralne.

Wykazano iż podanie LPS wywołuje aktywację układu odpornościowego matki i pojawienie się typowych objawów odpowiedzi na infekcję bakteryjną, a także zwiększenie ekspresji genów dla cytokin prozapalnych (*Il1b*, *Il6*, *Ifng* oraz *Tnf*), aktywację oksydazy NADPH (NOX) i wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w tkance płodowej.

Ponadto, już na tym etapie rozwoju zaobserwowano spadek mitochondrialnego potencjału błonowego oraz obniżony poziom mitochondrialnego ATP, co wskazuje na zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów. Testy behawioralne przeprowadzone na różnych etapach życia zwierząt potomnych prenatalnie narażonych na działanie MIA wykazały różnorakie ASD-podobne zaburzenia zachowań. Osutki w 10-11 dniu życia wykazywały pierwsze zaburzenia zachowań społecznych, wyrażone zmniejszoną liczbą wokalizacji w sytuacji stresowej (izolacja od matki). W 15 dniu życia zaobserwowano zmniejszone zainteresowanie zapachem gniazda, co również należy do zaburzeń społecznych. Choć nie zaobserwowano zachowań stereotypowych czy lękowych u starszych zwierząt, wykazano iż zwierzęta na pograniczu dorosłości (50 dzień życia) wykazują zaburzenia społeczne, to jest zmniejszoną towarzyskość oraz niskie zainteresowanie nowością społeczną.

W mózgu osesków po prenatalnej aktywacji układu odpornościowego dochodzi do wzrostu ekspresji wybranych cytokin prozapalnych takich jak *Il1b* i *Ifng*, co może promować rozwój reakcji zapalnej. Jednocześnie wzrasta aktywność oksydazy NADPH i poziomu RFT. Wraz ze wzrostem poziomu wolnych rodników uruchamiane są mechanizmy antyoksydacyjne, zwiększa się poziom czynnika transkrypcyjnego Nrf2, który stanowi jeden z kluczowych elementów odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny oraz wzrasta ekspresja dwóch podległych mu genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, peroksydazę glutationową oraz katalazę. Dochodzi również do obniżenia potencjału błony mitochondrialnej oraz spadku produkcji ATP, jednak łańcuch transportu elektronów funkcjonuje prawidłowo. Pomimo zaburzonego potencjału błony mitochondrialnej nie zaobserwowano zmian ilości mitochondriów oraz aktywacji mitofagii zależnej od PINK1 i parkiny, co sugeruje zwiększenie puli dysfunkcyjnych organelli w stosunku do ich całkowitej ilości. Wzrost ekspresji genów kodujących białka fuzji i fragmentacji, a także biogenezy mitochondriów może być mechanizmem kompensacyjnym w odpowiedzi na stres komórkowy.

Zmiany w mózgu potomstwa na dalszych etapach rozwoju są bardziej spektakularne niż te obserwowane u osesków. W korze mózgu młodego potomstwa z grupy MIA wykazano wzrost ekspresji *Il6* i *Tnf*, a także genów kodujących cyklooksygenazę 2 (COX-2) i lipoksygenazę 12-LOX, odpowiednio *Ptgs2* i *Alox12*, czemu towarzyszyła aktywacja mikrogleju. Takiego efektu nie zaobserwowano w hipokampie, co wskazuje na mniejszą wrażliwość tej struktury mózgu na MIA. Stanowi zapalnemu w mózgu towarzyszył stres oksydacyjny. W obu strukturach zaobserwowano podwyższony poziom RFT, choć tylko w

hipokampie dochodziło do aktywacji NOX. Wykazano także zaburzenia sytemu antyoksydacyjnego, jako iż w obu strukturach doszło do obniżenia stosunku GSH/GSSG, dodatkowo w hipokampie wykazano obniżenie poziomu Nrf2 i ekspresji *Sod1* i *Sod2*. Mitochondria na tym etapie rozwoju są poważnie uszkodzone w wielu ich aspektach działania, a zmiany są zależne od struktury mózgu. W korze mózgu doszło do obniżenia ekspresji oraz aktywności trzech kompleksów mitochondrialnych (CI (*mt-Nd1*), CIII (*mt-Cyb*) oraz CIV(*mt-Co1*)), a w hipokampie obniżona była ekspresja dla podjednostek CI (*mt-Nd1*) i CIV(*mt-Co1*), podczas gdy obniżoną aktywność wykazywały kompleksy CI i CIII. Ponadto wykazano spadek mitochondrialnego potencjału błonowego oraz obniżony poziom mitochondrialnego ATP. Dodatkowo w korze mózgu wykazano zwiększoną fragmentację mitochondriów, przy braku aktywacji mitofagii zależnej od PINK1 i parkiny w obu strukturach mózgu. Poziom ekspresji genów związanych z biogenezą, *Ppargc1*, *Nrf1* i *Tfam* w korze mózgu, oraz *Tfam* w hipokampie były obniżone, czemu towarzyszył spadek aktywności syntazy cytrynianowej, markera ilości mitochondriów, co sugeruje obniżenie ilości mitochondriów przy jednoczesnym braku usuwania uszkodzonych organelli. Analiza z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego wykazała liczne zmiany ultrastrukturalne mitochondriów w mózgu młodych zwierząt z grupy MIA. Zaobserwowano organella o zatartej strukturze grzebieni oraz błony mitochondrialnej. Wykazano również mitochondria wykazujące cechy obrzęku.

Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują, że aktywacja układu odpornościowego matki w ciąży zaburza funkcjonowanie i ultrastrukturę mitochondriów w mózgu potomstwa w sposób zależny od etapu rozwoju i struktury mózgu. Choć badania wymagają niewątpliwie kontynuacji i rozszerzenia, to dowodzą, że mitochondria mogą być potencjalnym celem dla nowych metod terapii autyzmu wywołanego infekcją matki na wczesnych etapach ciąży.

3. Streszczenie w języku angielskim

Autism spectrum disorders (ASD) are a diverse group of neurodevelopmental disorders, characterized by difficulties in social interaction and communication, as well as restrictive and repetitive behaviors. It is estimated that about 1% of children worldwide has ASD, and the amount of newly diagnosed cases rises yearly. Based on research obtained in the last few years, a theory has been formed, that ASD occurs as a result of influence of both genetic and environmental factors, including prenatal stress, such as maternal immune activation (MIA) during pregnancy. Epidemiological studies revealed a connection between maternal infection during pregnancy and increased risk of neurodevelopmental disorders, including ASD, in the progeny. It was also established that animal prenatally exposed to MIA show ASD-like behaviors later in life. Up until now, no research would focus of mitochondrial functioning in the brain of MIA offspring, even though mitochondrial dysfunction has been diagnosed in ASD patients. With all that in mind, and because efficient mitochondria are crucial for proper brain functioning not only prenatally, but throughout the lifespan, the aim of this research was to test the hypothesis that mitochondrial dysfunction and energy metabolism disturbance occur in ASD caused by maternal immune activation. In this research, animal model of MIA was induced by injection of lipopolysaccharide (LPS, 100 µg/kg b.w.) to pregnant Wistar rat at day 9.5 of pregnancy. Experiments were conducted on brains of the progeny, using immunochemical, luminescent, spectrophotometric, spectrofluorimetric and microscopic methods. ASD-like behavioral changes were also analyzed by proper behavioral tests.

It was shown that LPS injection causes activation of the maternal immune system and occurrence of symptoms typical for bacterial infection, as well as increase in expression of genes for proinflammatory cytokines (*Il1b*, *Il6*, *Ifng* and *Tnf*), NADPH oxidase activation and increase in reactive oxygen species (ROS) in fetal tissue. Moreover, already at this time point decreased mitochondrial membrane potential and ATP levels were observed, what indicates changes in mitochondrial functioning. Behavioral tests, performed at different points in offspring life revealed different, ASD-like changes in behavior. Infants at 10-11 postnatal day showed first signs of disturbed social behavior, as they vocalized less when isolated from mother and siblings, than their control counterparts. At postnatal day 15, MIA offspring showed less interest in home odor, in odor recognition test, what also suggests social behavior disturbance. Even though no stereotypical or anxiety behaviors were

observed, young adults (postnatal day 50) showed changes in social behavior, decreased sociability and decreased interest in social novelty.

There were signs of inflammation in the brain of infants prenatally exposed to MIA, as *Il1b* and *Ifng* expression was increased. At the same time, increased activity of NADPH oxidase and high levels of ROS were observed. It was accompanied by activation of antioxidative system, increased levels of Nrf2 and increased expression of *Gpx* and *Cat* genes. Additionally, decreased mitochondrial membrane potential and ATP levels were observed, even though there were no changes in activity or expression of mitochondrial electron transport chain. Moreover, despite observed changes in mitochondrial membrane potential, there was no difference in mitochondria content or levels of proteins involved in PINK1/parkin-dependent mitophagy. It suggests that there is a growing pool of dysfunctional mitochondria among healthy organelles. Finally, increased expression of genes for fission and fusion proteins, as well as for mitochondrial biogenesis, suggests some compensation mechanism, in response to cellular stress.

Changes observed later in life were more profound than in infancy. Increased expression of *Il6*, *Tnf*, *Ptgs2* and *Alox12* was demonstrated in cerebral cortex of MIA animals, which was accompanied by microglia activation. Such effect was not observed in hippocampus, which seems to be less sensitive to MIA influence. In both structures inflammation was accompanied by signs of oxidative stress, including increased ROS levels, and decreased GSH/GSSG ratio. However, only in hippocampus high activity of NADPH oxidase was observed. Moreover, decreased levels of Nrf2 and expression of *Sod1* and *Sod2* were demonstrated in this structure. It seems that mitochondria are disturbed at this time point in a structure-dependent manner. In cerebral cortex both expression and activity of three mitochondrial complexes (CI (*mt-Nd1*), CIII (*mt-Cyb*) and CIV(*mt-Co1*)) were decreased, whereas in hippocampus CI (*mt-Nd1*) and CIV(*mt-Co1*) showed decreased expression, while activity of CI and CIII was decreased. Moreover, it was demonstrated that mitochondrial membrane potential and ATP levels decreased in both structures, and in cerebral cortex fragmentation was increased, with no change in mitophagy. Expression levels of genes connected with biogenesis *Ppargc1*, *Nrf1* and *Tfam* were lower than in controls in cerebral cortex, *Tfam* expression was lower in hippocampus. In both structures it was accompanied by decreased activity of citrate synthase, marker of mitochondria content. Finally, analysis with transmission electron microscopy revealed many changes in

mitochondrial ultrastructure, including blurred cristae and mitochondrial membrane, and signs of mitochondrial swelling, in both structures.

To conclude, obtained results indicate that activation of the maternal immune system during pregnancy causes disturbance in mitochondrial functioning and ultrastructure in brain of the offspring, in an age-dependent and structure-dependent manner. Even though more research is required, it seems that mitochondria are good target for potential therapeutical intervention in ASD induced by maternal immune activation during pregnancy.

4. Innowacyjność rozprawy

- 1) Po raz pierwszy wykazano, że aktywacja układu odpornościowego matki w ciąży zaburza funkcjonowanie mitochondriów w mózgu potomstwa w sposób zależny od etapu rozwoju i struktury mózgu.
- 2) Udokumentowano aktywację oksydazy NADPH i zwiększoną produkcję anionorodnika ponadtlenkowego w życiu płodowym, co może prowadzić do nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów na tym etapie rozwoju potomstwa.
- 3) Po raz pierwszy udokumentowano uszkodzenia ultrastruktury mitochondriów w mózgu wywołane prenatalną ekspozycją na pobudzenie układu odpornościowego matki.

5. Wykaz rycin

Rycina 1. Wzrost diagnozowanych przypadków autyzmu wśród ośmiolatków w Stanach Zjednoczonych Ameryki.	31
Rycina 2. Indukcja ścieżki sygnałowej JAK/STAT3 przez IL-6.	42
Rycina 3. Zmiany w łożysku i w mózgu płodu w odpowiedzi na pobudzenie układu odpornościowego matki, skutkujące zaburzeniami neurorozwoju.	46
Rycina 4. Łańcuch transportu elektronów.	53
Rycina 5. Dynamika mitochondriów.	57
Rycina 6. Schemat przebiegu mitofagii zależnej od PINK1/parkiny.	59
Rycina 7. Klatka hodowlana.	65
Rycina 8. Boks wykorzystywany do trójkomorowego testu socjalizacji.	84
Rycina 9. Schemat przebiegu eksperymentu.	86
Rycina 10. Analiza stanu ciężarnych matek po podaniu LPS.	88
Rycina 11. Zdjęcie płodów wyizolowanych 24h po iniekcji LPS oraz zmiany w ekspresji genów dla cytokin prozapalnych w tkance płodowej.	89
Rycina 12. Poziom białka Iba1 w tkance płodowej 24h po podaniu LPS.	90
Rycina 13. Analiza poziomu ekspresji cytokin prozapalnych w łożyskach 24h po podaniu LPS.	90
Rycina 14. Generacja wolnych rodników w tkance płodowej w 24h po podaniu LPS. ...	91
Rycina 15. Wzrost aktywności oksydazy NADPH w tkance płodowej w 24h po podaniu LPS.	92
Rycina 16. Generacja O ₂ ^{•-} w tkance płodowej w 24h po podaniu LPS.	92
Rycina 17. Analiza poziomu nitrotyrozyny w tkance płodowej w 24h po podaniu LPS. ..	93
Rycina 18. Analiza funkcji mitochondriów w tkance płodowej w 24h po podaniu LPS. ..	94
Rycina 19. Analiza zaburzeń komunikacji i społecznych osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.	96
Rycina 21. Analiza zachowań społecznych u młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA mierzona przy użyciu trójkomorowego testu socjalizacji.	98
Rycina 23. Generacja wolnych rodników w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.	100
Rycina 24. Wzrost aktywności oksydazy NADPH w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.	100

Rycina 25. Generacja O2•- w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.	101
Rycina 26. Analiza poziomu nitrotyrozyny w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.	101
Rycina 27. Analiza immunoreaktywności białka Nrf2 w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.	102
Rycina 28. Analiza funkcji mitochondriów w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.	104
Rycina 29. Analiza funkcji łańcucha oddechowego w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.	105
Rycina 30. Analiza ekspresji i poziomu białek związanych z fuzją mitochondriów w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.	107
Rycina 31. Analiza ekspresji i poziomu białek związanych z dynamiką mitochondriów w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.	109
Rycina 32. Analiza ekspresji białek związanych z biogenezą mitochondriów i aktywności syntazy cytrynianowej w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.	111
Rycina 33. Analiza poziomu białek związanych z mitofagią w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.	112
Rycina 34. Analiza ekspresji genów związanych ze stanem zapalnym w korze mózgu i hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	114
Rycina 35. Analiza ekspresji genów dla cyklooksygenazy-2 i lipoksygenazy-12 w korze mózgu i hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	115
Rycina 36. Analiza ekspresji markerów aktywacji mikrogleju IL-1b i Arg1 oraz ich kolokalizacji z markerem Iba1 w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	117
Rycina 37. Analiza ekspresji markerów aktywacji mikrogleju IL-1b i Arg1 w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	118
Rycina 38. Analiza poziomu cytokin prozapalnych w surowicy młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	119
Rycina 39. Analiza poziomu RFT w korze mózgu oraz hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	121
Rycina 41. Analiza poziomu nitrotyrozyny w korze mózgu oraz hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	123

Rycina 42. Poziom białka Nrf2 w korze mózgu i hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	124
Rycina 43. Pomiar stosunku zredukowanej formy glutationu do jego formy utlenionej w korze mózgu i hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	126
Rycina 44. Analiza funkcji mitochondriów w korze oraz hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	127
Rycina 45. Analiza ekspresji i poziomu białek związanych z fuzją mitochondriów w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	130
Rycina 46. Analiza ekspresji i poziomu białek związanych z fragmentacją mitochondriów w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	132
Rycina 47. Analiza ekspresji i poziomu białek związanych z fuzją mitochondriów w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	134
Rycina 48. Analiza ekspresji i poziomu białek związanych z fragmentacją mitochondriów w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	135
Rycina 49. Analiza poziomu białek związanych z mitofagią w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	137
Rycina 50. Analiza poziomu białek związanych z mitofagią w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	138
Rycina 51. Analiza ekspresji białek związanych z biogenezą mitochondriów i aktywności syntazy cytrynianowej w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	139
Rycina 52. Analiza ekspresji białek związanych z biogenezą mitochondriów i aktywności syntazy cytrynianowej w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	140
Rycina 53. Analiza ultrastruktury mitochondriów w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	141
Rycina 54. Analiza ultrastruktury mitochondriów w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	142

6. Wykaz tabel

Tabela I. Wykorzystywane sondy TaqMan.....	69
Tabela II. Skład wykorzystywanych buforów.....	76
Tabela III. Warunki reakcyjne dla badanych białek	77
Tabela IV. Ekspresja wybranych genów związanych z systemem antyoksydacyjnym w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.....	103
Tabela V. Ekspresja wybranych genów związanych z systemem antyoksydacyjnym w korze mózgu i hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.	125
Tabela VI. Analiza ekspresji oraz aktywności białek łańcucha oddechowego w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.....	128
Tabela VII. Analiza ekspresji oraz aktywności białek łańcucha oddechowego w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA.....	129

7. Wstęp

7.1. Zaburzenia ze spektrum autyzmu

7.1.1. Obraz kliniczny zaburzeń ze spektrum autyzmu

Zaburzenia ze spektrum autyzmu (ang. autism spectrum disorders, ASD) należą do grupy całościowych zaburzeń rozwoju i charakteryzują się trudnościami w interakcjach społecznych, nieprawidłowościami w komunikacji werbalnej i niewerbalnej oraz obecnością sztywnych, stereotypowych wzorców zachowań i zainteresowań, upośledzających wszystkie aspekty życia [American Psychiatric Association, 2013]. Deficyty w zakresie interakcji społecznych i komunikacji obejmują trudności w nawiązywaniu i utrzymywaniu relacji z innymi ludźmi, u dzieci ze spektrum autyzmu obserwuje się brak zabawy symbolicznej, problemy w zawieraniu przyjaźni z rówieśnikami lub całkowity brak zainteresowania innymi dziećmi. Zaburzenia komunikacji niewerbalnej to przede wszystkim brak utrzymywania kontaktu wzrokowego oraz problemy z odczytywaniem mowy ciała i gestów. Sztywne wzorce zachowań obejmują stereotypie ruchowe lub słowne, np. szeregowanie przedmiotów, rytmiczne, mimowolne ruchy, zdania wypowiedzane zawsze w ten sam sposób. Pacjenci z ASD bardzo często przejawiają również silne przywiązanie do konkretnych obiektów, długotrwałe i głębokie zainteresowanie specyficznym tematem lub wąską dziedziną wiedzy. Mogą pojawiać się także nietypowe reakcje na bodźce, nadmierna lub niedostateczna wrażliwość na bodźce zmysłowe, np. nadwrażliwość na dźwięk czy dotyk lub obojętność wobec bólu czy też zmian temperatury [Lord *et al.*, 2018; Hodges *et al.*, 2020; Lord *et al.*, 2020]. Pierwsze objawy zaburzeń charakterystycznych dla ASD pojawiają się najczęściej już w okresie wczesnego dzieciństwa. Średni wiek otrzymania diagnozy autyzmu dziecięcego (F84.0 wg. ICD-10) to 3-5 lat [van 't Hof *et al.*, 2021], ale rodzice najczęściej zaczynają wyrażać zaniepokojenie obserwowanymi objawami w okolicach 2 roku życia dziecka [Zuckerman *et al.*, 2015]. Wczesna diagnoza i wdrożenie prawidłowej terapii wiąże się z ułatwionym funkcjonowaniem społecznym w późniejszym życiu [Rynkiewicz & Kulik, 2013]. Należy jednak podkreślić, iż osoby w spektrum autyzmu mogą prezentować bardzo różnorodny typ oraz nasilenie objawów, co może wiązać się z utrudnieniami w diagnostyce. Pacjenci z ASD są bardzo zróżnicowani, od niemal niezauważalnych objawów do niepełnosprawności intelektualnej, która dotyczy 30-50% pacjentów.

7.1.2. Diagnostyka i klasyfikacja zaburzeń ze spektrum autyzmu

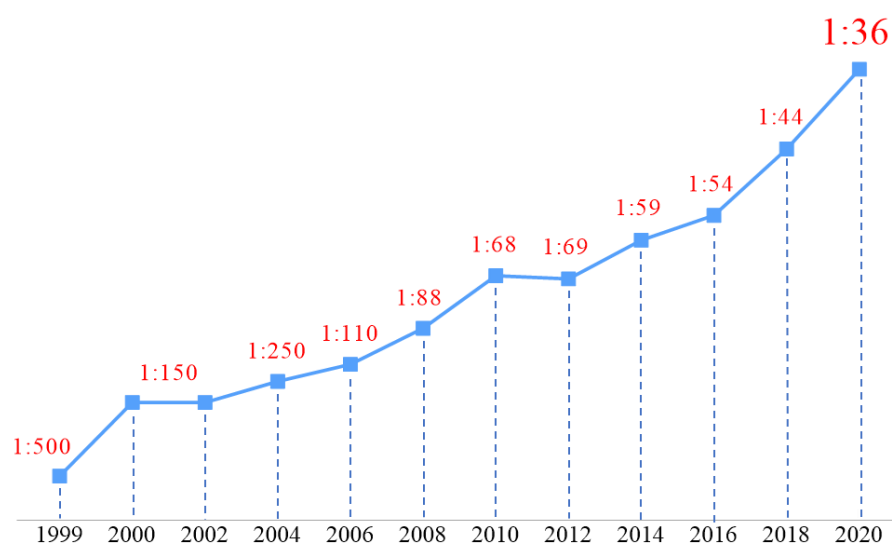
Do najczęściej stosowanych narzędzi w procesie diagnostycznym ASD należą poprawiony wywiad do diagnozowania autyzmu ADI-R (ang. Autism Diagnostic Interview – Revised, ADI-R) oraz protokół obserwacji do diagnozowania zaburzeń ze spektrum autyzmu ADOS-2 (ang. Autism Diagnostic Observation Schedule, Second Edition) [Rynkiewicz *et al.*, 2018]. Protokół ADOS-2 uwzględnia obserwację osoby badanej w czasie rzeczywistym, co pozwala na ocenę objawów ASD-typowych, skupiając się na komunikacji, interakcji społecznej, sztywnych i stereotypowych wzorcach zachowań, oraz zachowaniach związanych z zabawą. ADOS-2 może być wykonywany przez lekarzy, psychologów, logopedów czy pedagogów po ukończonym specjalistycznym szkoleniu. Wykorzystuje się go do diagnostyki dzieci od 12 miesiąca życia oraz u dorosłych [Chojnicka & Pisula, 2017]. ADI-R pozwala na ocenę diagnostyczną dzieci, młodzieży oraz dorosłych. Opiera się na przeprowadzonym przez diagnostę wywiadzie z rodzicami/opiekunami, a pytania dotyczą zarówno przebiegu rozwoju jak i bieżących zachowań osoby diagnozowanej, a więc kroków milowych, nabywania i utraty umiejętności, zdolności związanych z mową i komunikacją, rozwojem społecznym, wzorców zabaw, zainteresowań osoby badanej, a także występowania zachowań agresywnych (w tym autoagresji) i innych. Otrzymane informacje pozwalają nie tylko na diagnozę ASD, ale również na dobranie odpowiedniej terapii do indywidualnych potrzeb pacjenta [Chojnicka & Płoski, 2012]. W ostatnich latach, w związku z utrudnieniami w diagnostyce wynikającymi z pandemii COVID-19 (ang. coronavirus disease 2019), zaproponowano nowe narzędzie diagnostyczne oparte na ADOS-2, ale pozwalające na ocenę osoby badanej przez diagnostę z użyciem transmisji wideo lub nagrania - BOSA (ang. The Brief Observation of Symptoms of Autism). To obiecujące narzędzie pozwala na wystawienie diagnozy pacjentom nawet w mocno utrudnionych warunkach diagnostycznych, i wydaje się, iż może pozostać w użyciu nawet po ustąpieniu utrudnień związanych z pandemią [Dow *et al.*, 2022]. W końcu, coraz większy nacisk kładzie się na wczesne rozpoznawanie ASD u dzieci. Amerykańska Akademia Pediatrii (APP) zaleca prowadzenie badań przesiewowych podczas wizyt kontrolnych w 18-24 miesiącu życia dziecka, by zwiększyć wykrywalność ASD u tej grupy wiekowej. Ma to duże znaczenie, zważywszy na fakt, iż wczesna interwencja terapeutyczna wiąże się z osiąganiem lepszych rezultatów i podniesieniem komfortu życia zarówno dziecka, jak i całej rodziny. Wśród narzędzi diagnostycznych dostępnych w warunkach amerykańskich, dla dzieci poniżej 3

roku życia, wymienia się M-CHAT (ang. Modified Checklist for Autism in Toddlers), ITC (ang. Infant Toddler Checklist), STAT (ang. Screening Tool for Autism in Two-Year-Olds) czy Autism Observation Scale for Infants [Zwaigenbaum *et al.*, 2009]. Warto jednak podkreślić, iż diagnostyka ASD u dzieci poniżej 3 roku życia jest w Polsce znacznie mniej popularna niż w USA, a przeniesienie proponowanych badań przesiewowych na poziom praktyki klinicznej jest bardzo trudne.

W światowej psychiatrii obowiązują dwie klasyfikacje diagnostyczne pozwalające na rozpoznanie ASD: DSM-5 (ang. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – version 5) sporządzona przez Amerykańskie Towarzystwo Psychiatryczne oraz Międzynarodowa Statystyczna Klasyfikacja Chorób i Problemów Zdrowotnych ICD-11 (ang. International Classification of Diseases – version 11) sporządzona przez Światową Organizację Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO). W Polsce, od 1 stycznia 2022 roku obowiązuje ICD-11, jednak w praktyce klinicznej nadal korzysta się głównie ze starszej ICD-10, gdzie istnieje podział na: autyzm dziecięcy (F84.0), autyzm atypowy (F84.1), zespół Aspergera (F84.5) czy inne dziecięce zaburzenia dezintegracyjne (F84.3) [Chojnicka & Płoski, 2012]. W nowym ICD-11 zrezygnowano z wcześniejszych kategorii, a ASD (6A02) opisano w 7 różnych wariantach, uwzględniając poziom procesów poznawczych, głównie intelektu (obecność upośledzenia rozwoju intelektualnego) i języka (obecność upośledzenia funkcjonalnego języka) [Jastrzębowska, 2020]. DSM-5 jako pierwsze scaliło wszystkie jednostki diagnostyczne w ASD, podkreślając jednocześnie istnienie podgrup w populacji ASD charakteryzujących się trzema poziomami zależności od wsparcia (L1 - wymagający wsparcia, L2 - wymagający znacznego wsparcia, L3 - wymagający bardzo znacznego wsparcia) [Rynkiewicz & Kulik, 2013].

7.1.3. Epidemiologia zaburzeń ze spektrum autyzmu

Aktualne dane epidemiologiczne wskazują na rosnący trend występowania ASD. Szacuje się iż częstość występowania autyzmu wśród dzieci mieści się w zakresie od 0,19/1000 do 18,6/1000 w zależności od dobranych kryteriów diagnostycznych [Elsabbagh *et al.*, 2012; Chiarotti & Venerosi, 2020]. Co istotne, liczba osób z diagnozą spektrum autyzmu znacznie wzrosła na przestrzeni ostatnich lat [Rice *et al.*, 2007; Maenner *et al.*, 2020] (Rycina 1).



Rycina 1. Wzrost diagnozowanych przypadków autyzmu wśród ósmiolatków w Stanach Zjednoczonych Ameryki. Dane pochodzą z Centrum Kontroli i Prewencji Chorób (Center for Disease Control and Prevention, CDC). Wyniki badań publikowane są co 2 lata, w badaniu bierze udział 11 z 50 stanów USA. Na podstawie <https://tacanow.org/press-release/autism-prevalence-is-now-1-in-36/>

Na chwilę obecną nie ma dokładnych danych pozwalających określić ilość osób z ASD w Polsce. Zauważalny jest jednak wzrost liczby diagnozowanych przypadków. Dane dostępne w Systemie Informacji Oświatowej (SIO) pokazują, iż w latach szkolnych 2016/17–2018/19 liczba uczniów, którzy otrzymali diagnozę ASD zwiększała się co rok o około 20%. W roku szkolnym 2018/19 prawie 55 tys. dzieci z diagnozą ASD korzystało z kształcenia specjalnego, oznacza to 1 na 115 uczniów (0,87%). Dane Elektronicznego Krajowego Systemu Monitoringu Orzekania o Niepełnosprawności (EKSMOoN) wskazują, iż wśród osób niepełnosprawnych do lat 16, które otrzymały orzeczenie całościowych zaburzeń rozwojowych wydane w latach 2010-19, około 20% (44 302) to osoby z ASD, z czego 7 917 to dzieci do 3 roku życia, 15 968 to dzieci w wieku 4-7 lat, a 20 417 to dzieci od 8 do 16 lat [Walendzik & Nowak, 2021]. Należy jednak pamiętać iż nie wszystkie dzieci z ASD posiadają orzeczenie o niepełnosprawności, oraz przytoczone dane nie uwzględniają osób dorosłych, dlatego faktyczna liczba ludzi w Polsce dotkniętych tym zaburzeniem nie jest do końca znana. Nie wiadomo, co stoi za niepokojącym wzrostem przypadków autyzmu wśród dzieci. Możliwe iż obserwowany jest faktyczny wzrost ilości przypadków, choć zwiększenie ilości stawianych diagnoz może również wiązać się ze wzmożoną świadomością społeczną oraz ze zmianami w kryteriach diagnostycznych. Warto również wspomnieć, że mimo iż ASD diagnozowane jest we wszystkich grupach

etnicznych i socjoekonomicznych, uderza znaczna nierówność między płciami, szacuje się, iż u chłopców ASD występuje czterokrotnie częściej niż u dziewcząt [Maenner et al., 2020]. Jednakże pojawiają się doniesienia, sugerujące iż ta powszechnie przyjęta proporcja jest zaburzona. Obecnie wskazuje się na istnienie tak zwanego kobiecego fenotypu autyzmu, który manifestuje się w sposób odbiegający od „klasycznego”, męskiego fenotypu, co utrudnia właściwą diagnozę [Young et al., 2018]. Cechą kobiecego fenotypu ASD jest tak zwane „maskowanie”. Hipoteza maskowania proponuje, iż kobiety z ASD są w stanie w dużo większym stopniu niż mężczyźni naśladować społecznie akceptowane zachowania. Pozwala im to na skuteczne funkcjonowanie w społeczeństwie, co okupione jest jednak wyczerpaniem, stresem oraz stanami lękowymi [Tubío-Fungueiriño et al., 2021].

7.1.4. Etiologia zaburzeń ze spektrum autyzmu

Etiologia autyzmu nie została do końca określona, jest to zaburzenie uwarunkowane wieloczynnikowo. Rolę w rozwoju ASD odgrywają zarówno mechanizmy genetyczne, jak i czynniki środowiskowe oraz interakcje pomiędzy nimi [Lyll et al., 2017]. Badania z udziałem bliźniąt wykazały częstsze współwystępowanie autyzmu u bliźniąt monozygotycznych niż u dwuzygotycznych, co wskazuje na silne podłoże genetyczne [Tick et al., 2016]. Najważniejsze mutacje powiązane z ryzykiem wystąpienia ASD to mutacje w genach *TSC1/TSC2* oraz *FMRI*. Mutacje w jednym z dwóch genów *TSC* są przyczyną stwardnienia guzowatego (ang. tuberous sclerosis complex, TSC) i prowadzą do nadmiernej aktywacji kinazy mTOR (ssaczy cel rapamycyny, ang. mammalian target of rapamycin kinase), powodując niekontrolowaną proliferację, różnicowanie oraz migrację komórek, czego konsekwencją jest powstawanie guzów (hamartoma) na skórze, w mózgu, nerkach, sercu, siatkówce oka czy płucach. ASD diagnozuje się u około 45% chorych na TSC [Specchio et al., 2020]. Z kolei zespół łamliwego chromosomu X (ang. fragile X syndrome, FXS), związany z genem *FMRI* (ang. fragile X mental retardation 1) znajdującym się na chromosomie X, jest chorobą związaną z zaburzeniem dojrzewania i plastyczności synaptycznej [Niu et al., 2017]. Około 50% mężczyzn i 20% kobiet z FXS spełnia kryteria diagnostyczne dla ASD, natomiast wśród osób z diagnozą ASD, ok. 3% to chorzy z FXS [Fyke & Velinov, 2021]. Badania ostatnich lat wskazują również na znaczenie mutacji w genach *CHD8* (ang. chromodomain helicase DNA-binding protein 8, koduje białko biorące udział w regulacji cyklu komórkowego) [Weissberg & Elliott, 2021],

DYRK1A (ang. dual-specificity tyrosine- (Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A, mutacje w tym genie wpływają na rozwój dendrytów) [Dang *et al.*, 2018], czy *SCN2A* (ang. sodium voltage-gated channel alpha subunit 2, koduje kanał sodowy Nav1.2) [Kruth *et al.*, 2020]. Choć jak dotąd zaproponowano wiele genów, wariantów liczby kopii oraz mutacji *de novo*, które można powiązać z ASD [Lin *et al.*, 2021], uważa się, iż etiologia tego typu zaburzeń to więcej niż tylko czynniki genetyczne.

Mimo iż duża część przypadków ASD ma podłoże genetyczne [Rylaarsdam & Guemez-Gamboa, 2019], to dane ostatnich lat wskazują na znaczenie czynników środowiskowych. Ocenia się, iż przyczyny środowiskowe mogą odpowiadać za 20% [Bai *et al.*, 2019] do 40-50% przypadków [Masini *et al.*, 2020]. Wśród czynników środowiskowych wymienia się między innym niektóre leki przyjmowane przez matki w trakcie ciąży. Wzrost ryzyka wystąpienia ASD występował u dzieci prenatalnie narażonych na działanie talidomidu [Miller *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2021], leku o działaniu immunomodulacyjnym i przeciwzapalnym, czy też mizoprostolu [Miller *et al.*, 2004; Ornoy *et al.*, 2016], stosowanego m.in. w leczeniu choroby wrzodowej żołądka. Podobnie, prenatalne narażenie na kwas walproinowy (VPA, lek przeciwpadaczkowy) wywołuje u potomstwa zaburzenia zachowania typowe dla autyzmu [Christensen *et al.*, 2013; Gentile, 2014]. Do innych czynników środowiskowych zwiększających ryzyko wystąpienia ASD należą ekspozycja na zanieczyszczenie powietrza [Lam *et al.*, 2016], wpływ metali ciężkich [Alampi *et al.*, 2021], a także wpływ plastyfikatorów i zmiękczaczy (ftalany, tetrabromobisfenol A, bisfenol A, polichlorowane bifenylo) uwalnianych z powszechnie stosowanych tworzyw sztucznych [Panesar *et al.*, 2020; Alampi *et al.*, 2021]. Podkreśla się również znaczenie wieku ojca w momencie zapłodnienia [Wu *et al.*, 2017a] oraz występowanie niektórych chorób cywilizacyjnych u matki, np. cukrzycy [Xiang *et al.*, 2018]. Wreszcie, najpoważniejszym zagrożeniem dla rozwoju płodu są infekcje bakteryjne lub wirusowe matki na wczesnych etapach ciąży oraz odpowiedź układu odpornościowego matki na infekcję. Ekspozycja na patogeny takie jak wirus różyczki, wirus cytomegalii (CMV) czy *Toxoplasma gondii* znacznie zwiększa ryzyko wystąpienia u dziecka chorób neurorozwojowych i neuropsychiatrycznych, w tym ASD [Chess, 1977; Yamashita *et al.*, 2003; Severance *et al.*, 2016; Mawson & Croft, 2019]. Co ważne, podejrzewa się iż to intensywność aktywacji układu odpornościowego matki (ang. maternal immune activation, MIA), a nie rodzaj konkretnego patogenu, ma związek ze zwiększeniem ryzyka rozwoju ASD u potomstwa [Boulanger-Bertolus *et al.*, 2018].

Metaanaliza przeprowadzona przez Jiang i wsp. wykazała, iż matczyzna infekcja w trakcie ciąży, bez względu na to, czy była wirusowa czy też bakteryjna, wiązała się z 12% wzrostem ryzyka wystąpienia ASD u potomstwa [Jiang *et al.*, 2016]. W tej samej pracy autorzy zwracają uwagę, iż ryzyko znacznie wzrasta jeśli infekcja ma miejsce w pierwszym lub drugim trymestrze ciąży. Analiza danych zebranych przez Duński Medyczny Rejestr Urodzeń (Danish Medical Birth Register) wykazała, iż wśród potomstwa kobiet przyjętych do szpitala w pierwszym trymestrze z powodu infekcji wirusowej lub w drugim trymestrze z powodu infekcji bakteryjnej, wzrastał odsetek późniejszej diagnozy ASD [Atladóttir *et al.*, 2010; Atladóttir *et al.*, 2012]. Dane epidemiologiczne potwierdzane są również przez badania prowadzone na modelach zwierzęcych, między innymi na gryzoniach oraz zwierzętach naczelnych.

7.2. Zwierzęce modele autyzmu

Jak wspomniano wcześniej, istotną rolę w rozwoju autyzmu odgrywają zarówno uwarunkowania genetyczne, jak i czynniki środowiskowe. Badania na modelach zwierzęcych są głównym źródłem wiedzy na temat patologicznych zmian towarzyszących zaburzeniom ze spektrum autyzmu. Wśród modeli genetycznych opartych na mutacjach w obrębie pojedynczych genów, których mutacje mogą być związane z patogenezą autyzmu, najczęściej stosuje się zwierzęta modyfikowane genetycznie z mutacjami w genach *FMRI*, *SHANK3*, *TSC1/TSC2*, *NLGN* oraz *CNTNAP2* [Gzielo & Nikiforuk, 2021]. Powyższe geny kodują białka biorące udział w ścieżkach sygnalizacji regulujących translację i poziom białek synaptycznych, a także w funkcjonowaniu synaps. Myszy pozbawione ekspresji genu *Fmr1* (*Fmr1* KO) są najlepiej poznanym i najczęściej stosowanym modelem badawczym zespołu łamliwego chromosomu X (FXS) rekapitulującym symptomy ASD. Zahamowanie ekspresji genu *Fmr1* prowadzi do znacznego obniżenia poziomu białka FMRP, które uczestniczy w procesie translacji jako czynnik hamujący syntezę białek. FMRP kontroluje translację wielu ważnych białek synaptycznych kluczowych dla funkcjonowania neuronów, prawidłowego przekazywania synaptycznego i plastyczności synaptycznej. Brak inhibicji translacji przez FMRP prowadzi do zwiększonej ekspresji białek synaptycznych, co powoduje zmiany w strukturze i funkcji synaps. U myszy *Fmr1* KO obserwuje się nieprawidłowości w morfologii kolców dendrytycznych i zwiększony stosunek kolców niedojrzałych o kształcie filopodium do dojrzałych kolców dendrytycznych [Cheng *et al.*, 2019]. Zwierzęta *Fmr1* KO wykazują

również typowe dla autyzmu zaburzenia behawioralne, nieprawidłowe interakcje społeczne, zachowania powtarzalne oraz hiperaktywność [Pietropaolo *et al.*, 2011; Perez-Fernandez *et al.*, 2022]. Z kolei gen *Shank3* jest genem kodującym białko o krytycznym znaczeniu dla plastyczności synaps glutaminianergiczných. Utrata funkcjonalnej kopii tego genu może prowadzić do zachwiania równowagi pomiędzy układem hamującym i pobudzającym oraz powstawania zaburzeń ze spektrum autyzmu. U myszy z podwójnym knockout-em w genach *Shank3* i *Shank1* obserwowano zaburzenia interakcji społecznych, zachowania powtarzalne, zaburzenia pamięci i czynności ruchowych [Mossa *et al.*, 2021]. Mysi model stwardnienia guzowatego (TSC) wywołany mutacją w genie *Tsc2* (myszy *Tsc2^{+/-}*), której efektem jest nadmierna aktywacja kinazy mTOR i wzrost zależnej od mTOR translacji oraz zahamowanie procesu autofagii jest również powszechnie wykorzystywany do badań nad zaburzeniami funkcji synaptycznych w ASD. Jednym z najpoważniejszych objawów neuropsychicznych TSC są zaburzenia ze spektrum autyzmu. Wykazano, że utrata genu *Tsc2* lub *Tsc1* w komórkach Purkiniego powoduje zmiany behawioralne u myszy obejmujące między innymi zaburzenia interakcji społecznych i zachowania powtarzalne [Tsai *et al.*, 2012; Reith *et al.*, 2013]. Badania z wykorzystaniem myszy transgeniczných dowodzą, że nieprawidłowości w ekspresji postsynaptycznych neuroligin są przyczyną zaburzeń w przewodnictwie synaptycznym. Neuroliginy zaliczane są do białek adhezyjnych, „organizatorów” synapsy, a wraz z presynaptycznymi neureksynami odpowiadają za utrzymanie prawidłowej struktury synaps, co zapewnia prawidłowe przewodnictwo synaptyczne. Mutanty *NLGN1-KO* wykazywały zaburzenia pamięci i zachowania powtarzalne, *NLGN3-KO* zmniejszone wokalizacje i zaburzenia społeczne, *NLGN4-KO* wykazywały zaburzenia interakcji społecznych i komunikacji [Gao & Penzes, 2015]. Podobnie, mutacja w genie *CNTNAP2*, który koduje białko z rodziny neureksyn, pełniące funkcję strukturalną i adhezyjną jest związana z etiologią ASD. Mutanty *Cntnap2-KO* przejawiały zaburzenia zachowań społecznych, zachowania powtarzalne, nadmierną ruchliwość oraz nadwrażliwość na dźwięki [Scott *et al.*, 2020]. Genetyczne modele zaburzeń ze spektrum autyzmu pozwalają na badanie ścieżek, w które zaangażowane są konkretne geny i pozwalają na poszerzenie wiedzy na temat molekularnych mechanizmów kluczowych dla rozwoju zaburzeń synaptycznych oraz umożliwiają poszukiwanie nowych celów terapeutycznych dla terapii celowanych. Jednakże tylko u 10–30% osób z ASD udaje się ustalić przyczynę genetyczną, a u pozostałych przyczyny ASD pozostają nieznanne [Wozniak *et al.*, 2017]. Dlatego

prorowadzone są badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych opartych na działaniu czynników środowiskowych. Jednym z najczęściej stosowanych w tej dziedzinie modeli zwierzęcych jest model prenatalnej ekspozycji na VPA, stosuje się również podanie kwasu propionowego (ang. propionic acid, PPA).

VPA jest powszechnie stosowanym lekiem wykazującym właściwości przeciwpadaczkowe oraz stabilizującym zaburzenia nastroju i zachowania [Łoza, 2018]. VPA należy do inhibitorów deacetylaz klasy I i II α , jednak mechanizm jego działania jest złożony i nie został całkowicie poznany. Prenatalna ekspozycja na VPA wywołuje między innymi zaburzenia interakcji społecznych, zachowania stereotypowe oraz lękowe, a także deficyty poznawcze [Al Sagheer *et al.*, 2018; Campolongo *et al.*, 2018; Dai *et al.*, 2018; Elnahas *et al.*, 2021]. Badania prowadzone w Zakładzie Komórkowej Transdukcji Sygnału IMDiK PAN wykazały, że podanie VPA w jednorazowej dawce (450 mg/kg) w 12,5. dniu ciąży samicom szczurów stada Wistar wywołuje u potomstwa typowe dla autyzmu zaburzenia behawioralne, zaburzenia komunikacji, zachowania lękowe i repetytywne oraz upośledzenie procesów uczenia i pamięci [Gąssowska-Dobrowolska *et al.*, 2020]. Z kolei podanie PPA młodym szczurom wiąże się z zaburzeniami zachowań społecznych oraz czynności ruchowych [Shams *et al.*, 2019; Lobzhanidze *et al.*, 2020], jak również z wystąpieniem zachowań lękowych [Shams *et al.*, 2019]. Również prenatalne podanie PPA prowadziło do wystąpienia zaburzeń behawioralnych u potomstwa [Foley *et al.*, 2014; González-Cano *et al.*, 2021]. PPA jest metabolitem wytwarzanym przez bakterie na drodze fermentacji propionowej o właściwościach przeciwgrzybiczych, stosowanym przede wszystkim jako konserwant żywności i pasz [Pawlicka-Kaczorowska & Czaczyk, 2016].

Badania zmierzające do wyjaśnienia roli infekcji bakteryjnych lub wirusowych matki na wczesnych etapach ciąży w molekularnych mechanizmach zaburzeń autystycznych prowadzone są w oparciu o zwierzęce modele aktywacji układu odpornościowego matki - MIA, uzyskiwane poprzez podanie ciężarnym samicom na wczesnych etapach ciąży syntetycznej postaci dsRNA, kwasu poliinozynowego-policytydylowego (poli(I:C)), który indukuje odpowiedź przeciwwirusową, lub lipopolisacharydu (LPS), indukującego odpowiedź przeciwbakteryjną [Arsenault *et al.*, 2014]. Objawy ASD-podobne można uzyskać również poprzez prenatalne podanie interleukiny-6 (IL-6) [Boksa, 2010]. Podanie poli(I:C) naśladuje infekcje wirusowe poprzez aktywację receptora TLR3 (ang. toll-like receptor 3), co indukuje produkcję interferonu- α (IFN- α) i IFN- β . U potomstwa po prenatalnej ekspozycji na MIA indukowanej poli(I:C) obserwuje się ASD-podobne zmiany

behawioralne, w tym zaburzenia komunikacji, zachowań społecznych, zachowania lękowe i repetytywne [Giulivi *et al.*, 2013; Dabbah-Assadi *et al.*, 2019; Talukdar *et al.*, 2020]. Z kolei użycie LPS ma naśladować warunki infekcji bakteryjnej. LPS jest elementem ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, gdzie stanowi około 75% jej zewnętrznej powierzchni i należy do molekularnych wzorców związanych z patogenami (ang. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Część cząsteczki tej endotoksyny składa się z lipidu A, polisacharydowego rdzenia oraz antygeny O (łańcucha polisacharydowego) [Virzi *et al.*, 2022]. LPS wywołuje odpowiedź układu odpornościowego poprzez interakcje z receptorem TLR4 (ang. Toll-like receptor-4). U ssaków znanych jest 13 receptorów TLR, należących do receptorów rozpoznających wzorce (ang. pattern recognition receptors, PRR). Receptory TLR4 znajdują się przede wszystkim na komórkach pochodzących z linii mieloidalnej, takich jak komórki dendrytyczne, makrofagi, komórki mikrogleju, czy monocyty, ale również na komórkach nabłonka, fibroblastach czy niektórych neuronach [Vaure & Liu, 2014]. Rozpoznawanie LPS przez TLR4 jest procesem wieloetapowym, w który zaangażowanych jest kilka białek - LBP (ang. LPS-binding protein), CD14 (ang. cluster of differentiation 14) oraz kompleks TLR4/MD-2 (ang. myeloid differentiation factor 2). Po związaniu LPS dochodzi do uruchomienia dwóch szlaków sygnałowych, ścieżek zależnych od MyD88 lub TRIF (ang. myeloid differentiation primary response 88 i TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β). Ścieżka zależna od MyD88 prowadzi do zwiększenia ekspresji cytokin prozapalnych, podczas gdy ścieżka zależna od TRIF indukuje ekspresję interferonów typu I [Czerkies & Kwiatkowska, 2013]. Wykazano, iż podanie LPS ciężarnej matce prowadzi do wzrostu ekspresji cytokin prozapalnych w surowicy matki i tkankach płodowych, a następnie do wystąpienia ASD-podobnych zaburzeń behawioralnych u potomstwa [Fernández de Cossío *et al.*, 2017; Aria *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2021].

Istnieją również modele badawcze, w których uwzględnia się podatność genetyczną jak i wpływ czynników środowiskowych, np. modele *Cntnap2*-KO + poli(I:C) [Haddad *et al.*, 2023], *Cntnap2*-KO + LPS [Schaafsma *et al.*, 2017a], czy *Tsc2*^{+/-} i poli(I:C) [Ehninger, 2014].

7.3. Funkcjonowanie układu odpornościowego w ciąży

7.3.1. Znaczenie cytokin w rozwoju i utrzymaniu ciąży

Rozwój i utrzymanie ciąży wymaga szeregu fizjologicznych adaptacji organizmu matki, zwłaszcza układu odpornościowego, ze względu na potrzebę zachowania równowagi pomiędzy tolerancją dla semiallogenicznego płodu, a koniecznością ochrony przed patogenami [Fuhler, 2020]. Układ odpornościowy matki jest silnie zaangażowany w fizjologiczny przebieg ciąży, począwszy od implantacji zarodka aż do narodzin [Dutta & Sengupta, 2017]. Wśród komórek układu odpornościowego znajdujących się i działających na styku organizmu matki i organizmu dziecka wymienia się maciczne komórki NK (ang. uterine natural killer, uNK), makrofagi, limfocyty T i B oraz komórki dendrytyczne (ang. dendritic cells, DC) [Racicot *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2019]. Niezbędne dla prawidłowego przebiegu ciąży jest wydzielanie cytokin zarówno przez matkę, jak i przez rozwijający się płód. Długo uważano, iż w trakcie ciąży przeważać musi odpowiedź przeciwpalna, co pozwala na wytworzenie tolerancji organizmu matki wobec płodu oraz płodu wobec matki. Obecnie wiadomo, że kontrolowane, lokalne reakcje zapalne są niezbędne dla prawidłowego przebiegu ciąży, a nasilenie reakcji zapalnych i przeciwpalnych zmienia się w czasie, co widać w kolejnych trymestrach. Pierwszy trymestr ciąży to czas intensywnych zmian, zaś implantacja oraz powstawanie łożyska to procesy wymagające reakcji zapalnej. Aby mogło dojść do powstania łożyska konieczne jest najpierw kontrolowane uszkodzenie błony śluzowej macicy, a następnie zainicjowanie procesów naprawczych, co jest niemożliwe bez wytworzenia lokalnego środowiska zapalnego. W drugim trymestrze dochodzi do swego rodzaju wyciszenia i spokojnego rozwoju płodu, podczas którego dominują procesy przeciwpalne. W końcu w trzecim trymestrze zarówno organizm matki, jak i dziecka przygotowują się do porodu, któremu towarzyszy ponowny rozwój stanu zapalnego, indukującego skurcze macicy, sam poród, a w końcu odrzucenie łożyska [Mor *et al.*, 2011].

By ciąża mogła się rozwijać, po zapłodnieniu musi dojść do implantacji zarodka. Wkrótce po zapłodnieniu ma miejsce seria podziałów mitotycznych, na skutek których zarodek osiąga stadium blastocysty [Bukowska *et al.*, 2014]. Samą implantację można określić jako proces prowadzący do osiągnięcia bliskiego kontaktu między blastocystą a błoną śluzową wyścielającą macicę (endometrium), którego celem jest dostarczenie niezbędnych zarodkowi substancji odżywczych z naczyń krwionośnych matki. Po wejściu

zewewnętrznej warstwy blastocysty, tj. trofoblastu, w ścisły kontakt z powierzchnią nabłonka macicznego, dochodzi do tak zwanej inwazji trofoblastu, kiedy to komórki zarodka penetrują pomiędzy komórki przekształconego endometrium (doczesnej) [Dutta & Sengupta, 2017]. Następnie komórki trofoblastu zaczynają różnicować, indukując przekształcenie się doczesnej w maczyną część łożyska. Na dalszych etapach ciąży trofoblast przekształca się najpierw w kosmówkę, a w końcu w płodową część łożyska [Macura & Śliwa, 2015].

Wyróżnia się kilka kluczowych cytokin prozapalnych zaangażowanych w fizjologiczny przebieg ciąży na różnych jej etapach, wśród najważniejszych wymienia się czynnik hamujący białaczkę (ang. leukemia inhibitory factor (LIF)), IL-6 oraz IL-1 β [Ochoa-Bernal & Fazleabas, 2020]. LIF jest glikoproteiną o masie 38-67 kDa i należy do tej samej rodziny cytokin co IL-6. Badania z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ* wykazały, iż w macicy gryzoni od 4. dnia ciąży w nabłonku gruczołowym, a także w nabłonku jamy macicy następuje przejściowy wzrost ekspresji mRNA LIF, zbiegający się z rozpoczęciem implantacji [Yue *et al.*, 2015]. LIF wydzielany w trakcie implantacji kieruje inwazją trofoblastu, decidualizacją, a później także rozwojem łożyska [Ochoa-Bernal & Fazleabas, 2020]. Zwiększenie ekspresji IL-6 w trakcie implantacji jest mechanizmem konserwowanym ewolucyjnie [Yockey & Iwasaki, 2018]. W tym okresie IL-6 wydzielana jest zarówno przez endometrium, jak i przez zarodek [Dutta & Sengupta, 2017]. Następnie cytokina ta bierze udział w formowaniu łożyska, w przebiegu wczesnych stadiów ciąży, a w końcu odgrywa rolę w trakcie porodu, między innymi promując skurcze macicy [Prins *et al.*, 2012] oraz dojrzewanie szyjki macicy [Socha *et al.*, 2022]. Co ważne, IL-6 bierze również udział w rozwoju ośrodkowego układu nerwowego (OUN), gdzie moduluje rozwój komórek neuronalnych i glejowych [Zhao & Schwartz, 1998; Parker-Athill & Tan, 2010]. Z kolei IL-1 β wykazuje najwyższą ekspresję w pierwszym tryestrze ciąży [Ochoa-Bernal & Fazleabas, 2020], kiedy cytokina ta bierze udział w implantacji zarodka oraz w rozwoju łożyska [Equils *et al.*, 2020]. Uważa się ją także za mediator skurczy w trakcie porodu [Yockey & Iwasaki, 2018; Equils *et al.*, 2020]. Co więcej, IL-1 β jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju OUN [Zhao & Schwartz, 1998]. W rozwoju fizjologicznej ciąży bierze udział również TNF- α (czynnik martwicy nowotworów, ang. tumor necrosis factor α). Choć cytokina ta jest badana przede wszystkim w kontekście patologii, a jej wysoka ekspresja powiązana została z wieloma powikłaniami [Romanowska-Próchnicka *et al.*, 2021], wydaje się iż fizjologiczne stężenie TNF- α jest potrzebne dla prawidłowego

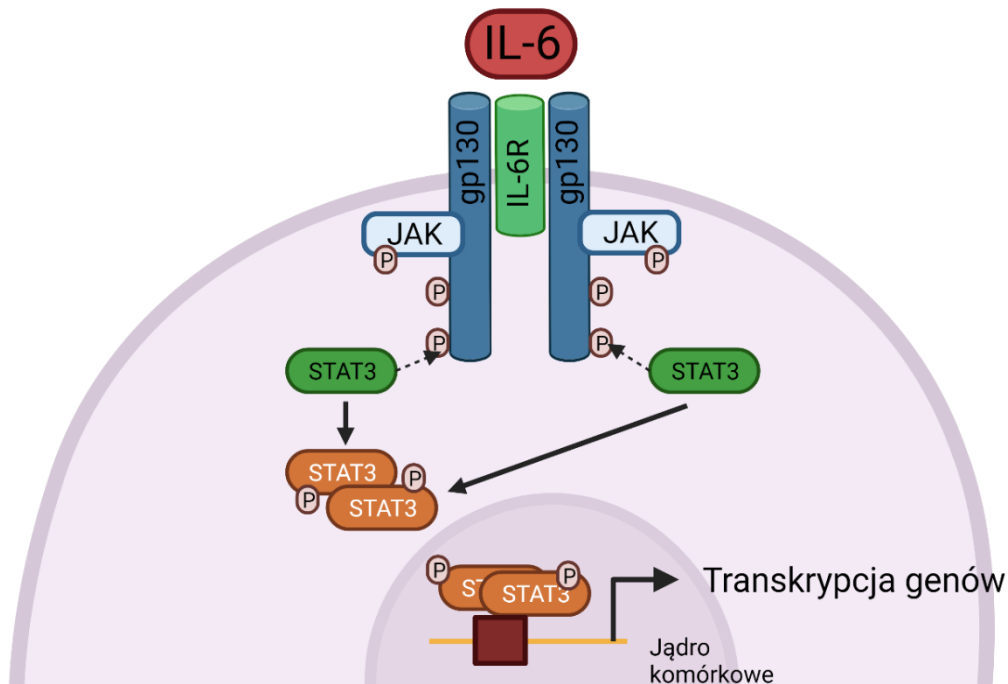
przebiegu ciąży. Uważa się, że TNF- α przyczynia się do prawidłowej implantacji zarodka [Argilés *et al.*, 1997; Dai *et al.*, 2022] oraz wpływa na różnicowanie komórek trofoblastu [Monzón-Bordonaba *et al.*, 2002], a także ma znaczenie w przebiegu porodu [Dai *et al.*, 2022]. Co więcej, przyjmowanie przez matkę w trakcie ciąży inhibitorów TNF- α powiązane ze zwiększonym ryzykiem występowania wad wrodzonych, jak również ze zwiększonym ryzykiem przedwczesnego porodu oraz niskiej masy urodzeniowej dziecka [Weber-Schoendorfer *et al.*, 2015]. Popiera to teorię, że fizjologiczne stężenie TNF- α ma pozytywny wpływ na rozwój płodu i przebieg ciąży. IFN- γ również jest istotną cytokiną, przede wszystkim na wczesnych etapach ciąży. U ludzi cytokina ta jest wydzielana przez komórki trofoblastu w trakcie implantacji [Murphy *et al.*, 2009]. Wykazano, iż IFN- γ promuje różnicowanie komórek NK w doczesnej, jak również bierze udział w formowaniu łożyska [Casazza *et al.*, 2020]. Zaobserwowano również, iż poziom IFN- γ w surowicy matki spada w trakcie porodu [Reyes-Lagos *et al.*, 2017]. Wśród pozostałych cytokin mających znaczenie w fizjologicznej ciąży wymienia się IL-8 (wpływ na prawidłowy przebieg porodu) [Ehsani *et al.*, 2019], IL-4 oraz IL-10 (promowanie rozwoju łożyska, modulacja inwazji trofoblastu i jego różnicowania, indukcja angiogenezy w łożysku, inhibicja cytokin prozapalnych) [Thaxton & Sharma, 2010; Chatterjee *et al.*, 2014], a także IL-17A (promowanie proliferacji komórek trofoblastu i jego inwazji w głąb doczesnej) [Wu *et al.*, 2014].

7.3.2. Cytokiny w warunkach infekcji. Znaczenie w przebiegu ciąży i w rozwoju płodu.

Infekcje bakteryjne lub wirusowe matki w czasie ciąży występują dość powszechnie. Nie są jednak dotychczas znane dokładne ścieżki molekularne prowadzące od MIA do ASD i innych schorzeń neurorozwojowych. Dane literaturowe sugerują, iż cytokiny odgrywają niebagatelną rolę w tym procesie, szczególnie jeśli weźmie się pod uwagę ich znaczenie w prawidłowym przebiegu ciąży i w rozwoju płodu [Yockey & Iwasaki, 2018]. Matczyne infekcje bakteryjne czy wirusowe mogą zaburzać wspomnianą wcześniej delikatną równowagę funkcjonowania układu odpornościowego ciężarnej i wywołać silną odpowiedź immunologiczną. Wiąże się to z intensywną sekrecją cytokin prozapalnych, co z kolei może prowadzić do rozwoju stanu zapalnego płodu oraz wpłynąć na jego rozwój. W związku z tym przypuszcza się, iż spowodowana przez MIA zmiana matczynego oraz płodowego

profilu cytokinowego ma kluczowe znaczenie w rozwoju ASD [Ravaccia & Ghafourian, 2020]. Szczególną uwagę w kontekście MIA poświęca się IL-6 oraz IL-1 β .

Chociaż wzrost ekspresji IL-6 wiąże się z naturalnym przebiegiem implantacji i prawidłowego przebiegu początku ciąży [Griffith *et al.*, 2017], jej zwiększony poziom może negatywnie wpływać na rozwój płodu [Samuelsson *et al.*, 2006; Prins *et al.*, 2012]. Podwyższony poziom IL-6 zaobserwowano zarówno w korze mózgu, jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym [Vargas *et al.*, 2005], a także w mózdzku [Wei *et al.*, 2011] autystycznych dzieci. Co więcej, badania na zwierzętach wykazały wzrost poziomu tej cytokiny w mózgu płodu krótko po wywołaniu MIA u matki [Vuillermot *et al.*, 2017; Simões *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019], a spowodowany MIA wzrost poziomu IL-6 w łożysku powiązany został ze zmianami behawioralnymi u potomstwa [Jiang *et al.*, 2018]. Istnieje kilka ścieżek, którymi IL-6 może dostać się do środowiska płodowego. Po pierwsze, może zadziałać pośrednio poprzez ścieżkę sygnałową JAK/STAT3 (ang. Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3) [Hsiao & Patterson, 2011] (Rycina 2). Po aktywacji matczynej układu odpornościowego dochodzi do wzrostu poziomu IL-6 we krwi, a co za tym idzie również w matczynej części łożyska. W łożysku IL-6 aktywuje komórki odpornościowe rezydujące w doczesnej, powodując sekrecję IL-6 *in situ*. Następnie IL-6 wiąże się do kompleksu receptorowego na powierzchni komórek doczesnej, zawierającego albo jedną związaną z membraną podjednostkę IL-6R albo rozpuszczalną podjednostkę sIL-6R i dwie podjednostki gp130 [Xu *et al.*, 2015; Baran *et al.*, 2018], co aktywuje ścieżkę JAK/STAT3. Aktywacja JAK prowadzi do rekrutowania i fosforylacji STAT3 i jego późniejszej dimeryzacji. Tak powstały kompleks translokuje się do jądra komórkowego, gdzie reguluje transkrypcję genów związanych z odpowiedzią ostrej fazy [Greenhill *et al.*, 2011; Estes & McAllister, 2015].



Rycina 2. Indukcja ścieżki sygnałowej JAK/STAT3 przez IL-6. Il-6 oddziałuje ze swoim receptorem IL-6R, tak powstały kompleks wiąże się do glikoproteiny 130 (gp130), indukując jej dimeryzację, a następnie aktywację przyłączonych kinaz JAK. Kinazy JAK fosforylują (P) specyficzne reszty tyrozyny na cytoplazmatycznej domenie gp130, które stają się miejscem przyłączenia dla domen SH2 białka STAT3. Prowadzi to do fosforylacji, dimeryzacji i translokacji STAT3 do jądra komórkowego, a w efekcie regulacji transkrypcji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną [Camporeale & Poli, 2012].

Badania Hsiao i Patterson wykazały, iż matczyne IL-6 aktywuje JAK/STAT3 w części płodowej łożyska, w wyniku czego dochodzi do wzrostu ekspresji genów odpowiedzi ostrej fazy [Hsiao & Patterson, 2011]. Ta sama grupa wykazała, że wzrost poziomu IL-6 prowadzi do spadku poziomu hormonu wzrostu (GH) w łożysku, co z kolei powoduje spadek ekspresji insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1) [Hsiao & Patterson, 2011]. Oba wymienione czynniki są niezbędne dla prawidłowego rozwoju płodu [Ravaccia & Ghafourian, 2020], a IGF-1 jest uważany za jeden z bardziej obiecujących punktów zaczepienia dla potencjalnej terapii łagodzącej objawy ASD [Linker *et al.*, 2020]. Wu i współpracownicy wykazali, iż indukcja IL-6 w łożysku jest czynnikiem koniecznym, by doszło do indukowanych przez MIA zmian w mózgu płodu. Badania prowadzono z wykorzystaniem myszy knock-out, pozbawionych IL-6R w trofoblaście. Zaobserwowano, że przy braku transdukcji sygnału

indukowanej przez IL-6 w trofoblaście, nie dochodziło do indukowanej przez MIA odpowiedzi zapalnej zarówno w łożysku, jak i w mózgu płodu [Wu *et al.*, 2017b].

Co ważne, sugeruje się iż matczyzna IL-6 ma zdolność do przedostawania się przez łożysko do środowiska płodowego zarówno u ludzi [Zaretsky *et al.*, 2004], jak i u szczurów [Dahlgren *et al.*, 2006]. Zważywszy na niedojrzałość bariery krew-mózg u płodu [Conroy *et al.*, 2004], można podejrzewać iż matczyzna IL-6 może oddziaływać bezpośrednio na rozwijający się mózg, indukując syntezę płodowych cytokin prozapalnych, prawdopodobnie poprzez wspomnianą ścieżkę JAK/STAT3. Badania prowadzone na myszach transgenicznym z chronicznie zawyżoną ekspresją IL-6 w OUN wykazywały objawy astrogliozy oraz zmian w funkcjonowaniu neuronów, szczególnie w hipokampie i w mózdku, czemu towarzyszyły zmiany behawioralne [Conroy *et al.*, 2004]. Co więcej, podwyższony poziom IL-6 powiązано z zaburzeniami synaps w mózgu zwierząt modelowych [Wei *et al.*, 2013], a pojedyncze podanie IL-6 ciężarnym myszom wywoływało zaburzenia behawioralne u potomstwa [Smith *et al.*, 2007; Hsiao & Patterson, 2011]. Ponadto, badania na modelu MIA wywoływanym podaniem poli(I:C) wykazały, że jednoczesne podanie poli(I:C) i przeciwciała skierowanego przeciwko IL-6 zapobiega zaburzeniom behawioralnym u potomstwa [Smith *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2016]. Obecnie molekularne mechanizmy działania IL-6 w zaburzeniach ze spektrum autyzmu nie są jednak w pełni wyjaśnione i sugeruje się również udział innych cytokin prozapalnych, w tym IL-1 β .

IL-1 β wydzielana jest przez wiele różnych typów komórek, między innymi makrofagi, DC, monocyty i komórki mikrogleju [Rosenzweig *et al.*, 2014]. Podwyższony poziom tej cytokiny obserwowany był we krwi osób z ASD [Saghazadeh *et al.*, 2019]. Wykazano również zwiększoną ekspresję IL-1 β w mózgu płodów poddanych działaniu MIA [Vuillermot *et al.*, 2017; Simões *et al.*, 2018] oraz w monocytach w hodowli pochodzących od pacjentów pediatrycznych z ASD w odpowiedzi na stymulację receptora TLR4 [Enstrom *et al.*, 2010]. Nie wiadomo do końca, czy IL-1 β obserwowana w mózgu płodu w warunkach działania MIA jest pochodzenia matczynego, czy też płodowego. Cytokina ta nie przechodzi przez łożysko. Wiadomo, iż jej ekspresja i sekrecja, oprócz indukcji przez stymulację TLR4, może być również indukowana poprzez podwyższony poziom innych cytokin prozapalnych, takich jak IL-6 [Rosenzweig *et al.*, 2014], IL-17 [Jovanovic *et al.*, 1998], oraz przez samą siebie [Chudnovets *et al.*, 2020]. Możliwe jest, że cytokiny prozapalne wydzielane przez łożysko i przechodzące do przestrzeni płodowej, stymulują ekspresję płodowej IL-1 β ,

wymaga to jednak dalszego potwierdzenia w badaniach. Niezależnie od jej pochodzenia, wiadomym jest, iż IL-1 β ma wpływ na rozwój mózgu u płodu, co więcej, wykazano istotny udział IL-1 β w powstawaniu zaburzeń neurorozwojowych. Crampton i wsp. wykazali, że IL-1 β hamuje proliferację komórek progenitorowych w kierunku neuronalnym, promując jednocześnie różnicowanie w kierunku komórek glejowych [Crampton *et al.*, 2012]. Dootrzewnowa iniekcja IL-1 β ciężarnym myszom w 14-17 dniu ciąży prowadziła do zmniejszenia przeżywalności płodów oraz wiązała się ze zmniejszeniem liczby neuronów kory mózgu u płodów [Chudnovets *et al.*, 2020]. W innym badaniu wykazano, iż jednoczesne podanie ciężarnym samicom LPS oraz antagonisty receptora dla IL-1 (ang. IL-1 receptor antagonist, IL-1Ra) zapobiegało zaburzeniom behawioralnym u potomstwa [Girard *et al.*, 2010].

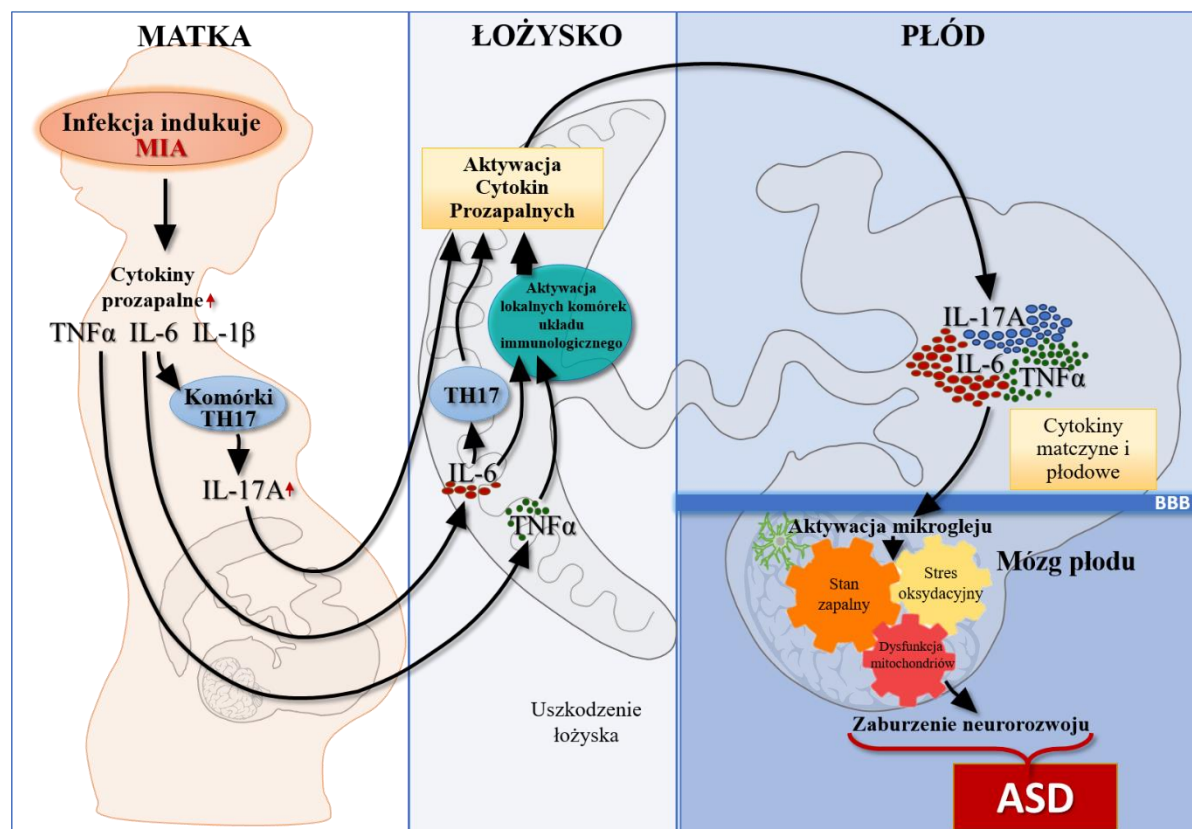
Wskazuje się również na podwyższony poziom TNF- α w zaburzeniach neurorozwojowych, w tym w ASD. Wykazano podwyższony poziom tej cytokiny we krwi dzieci z ASD, co więcej stężenie TNF- α pozytywnie korelowało z intensywnością objawów ASD obserwowanych u badanych dzieci [Xie *et al.*, 2017]. Metaanaliza dotycząca cytokin prozapalnych u osób z autyzmem wykazała istotne podwyższenie poziomu TNF- α w surowicy w grupie ASD [Saghazadeh *et al.*, 2019]. Podwyższony poziom tej cytokiny w trakcie ciąży powiązано z wieloma powikłaniami, między innymi ze stanem przedrzucawkowym [Spence *et al.*, 2021], z nawracającymi poronieniami idiopatycznymi [Liu *et al.*, 2022a] czy ryzykiem przedwczesnego porodu [Herrera-Muñoz *et al.*, 2017]. Wykazano, iż w modelu MIA wywołanym podaniem LPS, brak receptora dla TNF- α (TNFR1) w łożysku chronił przed hipoksją oraz zmniejszoną proliferacją nerwowych komórek macierzystych w mózgu płodu [Carpentier *et al.*, 2011].

Podwyższony poziom IFN- γ również wydaje się mieć znaczenie w ASD. Podobnie jak w przypadku TNF- α , metaanaliza dotycząca cytokin prozapalnych u osób z autyzmem wykazała istotne podwyższenie poziomu IFN- γ w osoczu w grupie ASD [Saghazadeh *et al.*, 2019]. Wykazano, iż poziom IFN- γ w surowicy dzieci z ASD korelował negatywnie z wynikami oceny zdolności poznawczych [Sasayama *et al.*, 2017]. Podwyższony poziom IFN- γ w surowicy matek w połowie ciąży (15-19 tydzień) powiązано ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia ASD u dziecka [Goines *et al.*, 2011]. W modelu MIA wywołanym podaniem LPS zaobserwowano wzrost poziomu IFN- γ w mózgach płodów zarówno po 6 jak i po 24h od indukcji MIA [Simões *et al.*, 2018]. Badania prowadzone z wykorzystaniem małp (makak królewski), u których matek wywoływano MIA poprzez podanie poli(I:C)

wykazały podwyższony poziom IFN- γ zarówno w surowicy jak i w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cell, PBMC) u rocznych zwierząt, oraz tendencję wzrostową u zwierząt czteroletnich [Rose *et al.*, 2017]. Z drugiej strony, wyniki badań na szczurzych i mysich modelach MIA nie są całkowicie jednoznaczne, Garay i wsp. wykazali, iż poziom IFN- γ zależy od struktury mózgu oraz od wieku potomstwa [Garay *et al.*, 2013], a Pendyala i wsp. zaobserwowali obniżenie poziomu IFN- γ w mózdzku 30 dniowych myszy [Pendyala *et al.*, 2017].

IL-17A (powszechnie nazywana Il-17) to cytokina prozapalna wytwarzana przez komórki TH17 (IL-17A⁺CD4⁺ T), których różnicowanie jest zależne od wielu czynników transkrypcyjnych, w tym STAT3 oraz jądrowego receptora sierocego (retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t, ROR γ t) [Jin & Dong, 2013]. Badania prowadzone na modelu MIA wykazały, iż matczyne komórki CD4⁺ T z ekspresją ROR γ t są niezbędne dla wystąpienia fenotypu ASD-podobnego u potomstwa [Choi *et al.*, 2016]. Receptory te są regulowane przez IL-6, więc zwiększenie poziomu IL-6 w łożysku i/lub w mózgu płodu prowadzi do zwiększenia ekspresji IL-17A, która z kolei promuje wytwarzanie wielu innych cytokin, w tym IL-6, IL-1 β , i TNF- α [Wong & Hoeffler, 2018]. Podwyższony poziom IL-17A obserwowano w surowicy dzieci z ASD [Al-Ayadhi & Mostafa, 2012] oraz w neutrofilach pacjentów z ASD [Nadeem *et al.*, 2019]. Wysoki poziom tej cytokiny powiązано z kilkoma chorobami autoimmunologicznymi, powiązано ją również z chorobami układu nerwowego, takimi jak epilepsja, niedokrwienie czy stwardnienie rozsiane [Wong & Hoeffler, 2018].

Podsumowując, zwiększenie poziomu cytokin prozapalnych w łożysku, a następnie w mózgu płodu, w odpowiedzi na systemowy stan zapalny u matki w trakcie ciąży, może wpływać na zaburzenie neurorozwoju potomstwa. Cytokiny prozapalne przekraczające formującą się barierę krew-mózg (ang. blood-brain barrier, BBB) mogą inicjować stan zapalny w mózgu w wyniku aktywacji lokalnych przedstawicieli układu odpornościowego, komórek mikrogleju (Rycina 3).



Rycina 3. Zmiany w łożysku i w mózgu płodu w odpowiedzi na pobudzenie układu odpornościowego matki, skutkujące zaburzeniami neurorozwoju. Czynniki środowiskowe takie jak infekcja w trakcie ciąży aktywują odpowiedź układu odpornościowego matki, który uwalnia cytokiny prozapalne, m.in. IL-6, IL-1β i TNF-α. IL-6 pobudza komórki TH17 do wydzielania IL-17A. Podwyższony poziom matczynek cytokin prozapalnych w łożysku powoduje aktywację lokalnych komórek układu immunologicznego i miejscową ekspresję cytokin prozapalnych, co może prowadzić do uszkodzeń łożyska. Część cytokin może przekraczać łożysko i stymulować produkcję cytokin w tkankach płodu. Niedojrzała bariera krew-mózg (BBB) pozwala cytokinom dotrzeć do rozwijającego się mózgu, gdzie inicjują one miejscowy stan zapalny, co prowadzi do aktywacji mikrogleju, generacji stresu oksydacyjnego i może przyczyniać się do uszkodzenia mitochondriów. Wszystkie wymienione czynniki mogą zaburzać rozwój mózgu, co w efekcie może prowadzić do rozwoju ASD w kolejnych etapach życia. Rycina adaptowana na podstawie [Zawadzka *et al.*, 2021].

7.4. Rola mikrogleju w zaburzeniach neurorozwojowych indukowanych aktywacją układu odpornościowego matki w ciąży

Komórki mikrogleju nazywane są makrofagami układu nerwowego, choć różnią się w kilku aspektach od makrofagów znajdujących się na obwodzie. Podstawową różnicą jest odseparowanie komórek mikrogleju od pozostałych makrofagów przez BBB. Wskazuje się również na pewne różnice w pochodzeniu mikrogleju i makrofagów obwodowych. Choć makrofagi w życiu płodowym wywodzą się najprawdopodobniej z pęcherzyka żółtkowego i obszaru AGM (ang. aorta-gonad mesonephros), w późniejszym życiu duża część makrofagów na obwodzie jest uzupełniana i zastępowana z krążących z krwią monocytów. Komórki mikrogleju najprawdopodobniej również wywodzą się z pęcherzyka żółtkowego, skąd już w życiu płodowym migrują do rozwijającego się OUN, gdzie osiadają i proliferują, a ich populacja nie jest w późniejszym życiu uzupełniana z monocytów, pod warunkiem, że bariera krew-mózg pozostaje nienaruszona [Márquez-Ropero *et al.*, 2020]. Komórki mikrogleju w mózgu płodu różnią się od tych w dojrzałym mózgu zarówno morfologicznie jak i ekspresją specyficznych markerów. Co więcej, wykazano iż płodowy mikroglej proliferuje bardziej intensywnie niż dorosły [Prinz *et al.*, 2019]. Dojrzewanie mikrogleju płodowego jest zależne od sygnałów pochodzących z rozwijającego się OUN, takich jak czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytarnych (ang. colony-stimulating factor 1 (CSF1), IL-34 oraz transformujący czynnik wzrostu β (ang. transforming growth factor β , TGF β). Co więcej, wykazano że, OUN w dojrzałym organizmie, nie ma zdolności do całkowitego indukowania różnicowania monocytów pochodzących ze szpiku kostnego do mikrogleju, co sugeruje iż pochodzenie z pęcherzyka żółtkowego i interakcje z płodowym OUN są kluczowe dla dojrzewania właściwego mikrogleju [Thion *et al.*, 2018].

Podstawową funkcją komórek mikrogleju jest ochrona OUN przed patogenami. Są one również wyspecjalizowane w utrzymywaniu homeostazy w OUN, gdzie wchodzi w interakcje z neuronami, biorą udział w przemodelowaniu synaps, wpływają na neurogenezę i biorą udział w procesach naprawczych [Borst *et al.*, 2021]. W warunkach fizjologicznych komórki mikrogleju pozornie sprawiają wrażenie pozostających w spoczynku, jednak ich rozliczne wypustki nieustannie się poruszają, skanując otoczenie i wchodząc w interakcje z innymi komórkami [Smolders *et al.*, 2018]. W przypadku wystąpienia infekcji czy urazu dochodzi do natychmiastowych zmian w funkcjonowaniu mikrogleju. W zdrowym mózgu, mikroglej może być aktywowany przez szeroki zakres

substancji, nie tylko patogeny, ale również agregaty białek czy komórki apoptotyczne [Subhramanyam *et al.*, 2019]. Aktywacja mikrogleju wiąże się ze zmianą fenotypu, kiedy to komórki mikrogleju skracają wypustki, jednocześnie zwiększając liczbę rozgałęzień, dochodzi do powiększenia ciała komórki oraz do uwalniania czynników efektorowych, m. in. cytokin [Mondelli *et al.*, 2017]. W zależności od potrzeb i konkretnego bodźca wywołującego aktywację, komórki te mogą wydzielać cytokiny prozapalne (np. IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-23, i IL-18), reaktywne formy tlenu (RFT), tlenek azotu (NO), jak również substancje o działaniu neuroprotektynym, takie jak czynniki wzrostu (np. TGF β) i cytokiny przeciwzapalne (np. IL-10, IL-4, IL-13) [Kierdorf & Prinz, 2013; Wendimu & Hooks, 2022]. Nadmierne wydzielanie cytokin prozapalnych przez mikroglej wiąże się z rozwojem intensywnego stanu zapalnego w OUN (ang. neuroinflammation). Indukowany przez mikroglej stan zapalny, jak również różnorakie dysfunkcje mikrogleju powiązane z wieloma zaburzeniami OUN, w tym również z ASD.

Wykazano obecność aktywowanego mikrogleju w mózгах młodych osób z ASD [Suzuki *et al.*, 2013]. Badania prowadzone na próbkach mózgu pobranych *post mortem* wykazały ślady zwiększonej aktywacji mikrogleju w mózdzku oraz w istocie białej pacjentów z ASD w porównaniu do kontroli [Vargas *et al.*, 2005]. Podobne obserwacje poczyniono w korze mózgu [Vargas *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2010], gdzie zaobserwowano również zwiększoną gęstość mikrogleju [Tetreault *et al.*, 2012] a także zwiększone grupowanie się mikrogleju wraz z neuronami [Morgan *et al.*, 2010], co sugeruje rekrutowanie komórek mikrogleju przez neurony. Aktywacja mikrogleju, szczególnie długotrwała, nie może pozostawać bez wpływu na funkcjonowanie OUN, ale konkretne konsekwencje takiego stanu wymagają dalszych badań. Badania nad mikroglejem prowadzone są również na modelach zwierzęcych. Jednak w przypadku MIA, wyniki uzyskane na zwierzętach nie są na tę chwilę rozstrzygające. Podczas gdy niektórzy badacze zaobserwowali zwiększenie gęstości mikrogleju u zwierząt MIA [Girard *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014], zmiany w morfologii tych komórek [Gumusoglu *et al.*, 2017; O'Loughlin *et al.*, 2017; Corradini *et al.*, 2018] lub zmiany w poruszaniu się ich wypustek [Ozaki *et al.*, 2020], inni nie zaobserwowali tego typu zmian [Hsiao *et al.*, 2012; Garay *et al.*, 2013; Giovanoli *et al.*, 2015; Mouihate, 2016]. Różnice w uzyskanych przez badaczy wynikach mogą być powodowane różnorodnymi metodami wywoływania MIA w wykorzystywanym modelu, różnorodnych punktach czasowych oraz rejonach mózgu wybranych do analizy, a także w niejednorodnych kryteriach dotyczących zdefiniowania aktywacji mikrogleju [Smolders *et*

al., 2018]. Mimo to, zaproponowanych zostało kilka ścieżek mogących prowadzić od MIA, poprzez mikroglej aż do zmian neurologicznych. Schaafsma i wsp. wykazali iż MIA wywołane podaniem LPS wywołało długofalowe zmiany we wrażliwości mikrogleju u dorosłych zwierząt, a płodowy mikroglej jest odpowiedzialny za sekrecję cytokin prozapalnych, co przyczyniło się do rozwoju stanu zapalnego w OUN, co mogło wpłynąć na dalszy rozwój mózgu [Schaafsma *et al.*, 2017b]. Ozaki i wsp. zaobserwowali iż MIA spowodowało zmiany w ruchliwości wypustek mikroglejowych, co zaobserwowano już w 18 dniu ciąży a utrzymywało się aż do nastoletniości [Ozaki *et al.*, 2020]. Przywołane badania sugerują iż obserwowane zmiany w funkcjonowaniu mikrogleju mogą mieć wpływ na funkcje oraz plastyczność neuronów, a także mogą przyczyniać się do podatności osobników prenatalnie poddanych działaniu MIA na wystąpienie chorób neurorozwojowych. Coraz więcej dowodów wskazuje na fundamentalne znaczenie interakcji mikroglej - neuron w prawidłowym rozwoju mózgu, a także w utrzymaniu homeostazy w OUN. Wydaje się, iż MIA może być jednym z czynników zaburzających tego typu interakcje.

7.5. Stres oksydacyjny w autyzmie i w zwierzęcych modelach chorób neurorozwojowych

Reaktywne formy tlenu uwalniane w ilościach bezpiecznych dla komórki, odgrywają ważną rolę mediatorów i regulatorów wielu procesów komórkowych [Schieber & Chandel, 2014], jednak w wyniku zaburzenia równowagi pomiędzy procesami oksydacyjnymi, które indukują produkcję RFT, a systemami antyoksydacyjnymi dochodzi do stresu oksydacyjnego, który może prowadzić do uszkodzenia komórki i inicjować różnego rodzaju procesy patologiczne, w tym prowadzić do aktywacji stanu zapalnego [Sies *et al.*, 2017]. Z kolei infekcja, aktywacja komórek układu odpornościowego i tocząca się reakcja zapalna zwiększają produkcję wolnych rodników. Do najważniejszych RFT należy anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy ($\bullet OH$) oraz tlen singletowy (1O_2). Głównym producentem wolnych rodników jest przede wszystkim mitochondrialna fosforylacja oksydacyjna [Pizzino *et al.*, 2017]. Innym ważnym źródłem RFT w komórce jest aktywność enzymów z rodziny oksydaz NADPH (NOX), ewolucyjnie konserwowanych białek transbłonowych, transportujących elektrony z NADPH, poprzez FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy) na O_2 , co skutkuje wytworzeniem $O_2^{\cdot-}$ [Terzi &

Suter, 2020]. Wyjątkiem jest NOX4 zlokalizowana w błonie mitochondrialnej [Shanmugasundaram *et al.*, 2017] i w siateczce śródplazmatycznej [Laurindo *et al.*, 2014], oraz DUOX2 katalizująca powstawanie H₂O₂. U większości ssaków występuje siedem izoform NOX (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, dioksygenaza DUOX1 i DUOX2), których ekspresja różni się w zależności od tkanki [Brandes *et al.*, 2014]. Kilka z wymienionych izoform obecnych jest w OUN, NOX1, NOX2, NOX3, i NOX4 zaobserwowano w neuronach, podczas gdy w astrocytach i w mikrogleju występują NOX1, NOX2, i NOX4 [Nayernia *et al.*, 2014]. Warto zaznaczyć, iż ekspresja NOX2 w mikrogleju utrzymuje się na niskim poziomie w stanie spoczynku tych komórek i wzrasta po ich aktywacji [Nayernia *et al.*, 2014].

Dla zachowania homeostazy, komórki zwierzęce wykształciły sprawnie funkcjonujący system antyoksydacyjny. Jednym z jego elementów jest czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2) [Sies *et al.*, 2017]. Gdy komórka nie znajduje się w warunkach stresowych, Nrf2 pozostaje w cytoplazmie, związany z białkiem Keap1 (ang. kelch like ECH associated protein 1), co prowadzi do ubiquitynacji i degradacji Nrf2. W obecności RFT dochodzi do inaktywacji Keap1 i rozluźnienia jego wiązania z Nrf2, co prowadzi do stabilizacji tego ostatniego, oraz jego translokacji do jądra komórkowego. Następnie dochodzi do dimeryzacji Nrf2 z małymi białkami Maf (ang. musculoaponeurotic fibrosarcoma) i związania z elementem odpowiedzi antyoksydacyjnej (ang. antioxidant response element, ARE) [Tonelli *et al.*, 2018]. Prowadzi to do aktywacji różnorodnych genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, które stanowią pierwszą linię obrony przed RFT [Ahmed *et al.*, 2017]. Należą do nich przede wszystkim dysmutazy ponadtlenkowe (ang. superoxide dismutases, SODs), katalizujące reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego, katalaza (CAT) rozkładająca nadtlenek wodoru, reduktaza tioredoksyny (ang. thioredoxin reductase, TrxR) oraz peroksydazy glutationowe (ang. glutathione peroxidases, GPxs) [Ighodaro & Akinloye, 2018; Ayaydin *et al.*, 2020]. Dysmutazy ponadtlenkowe, metaloenzymy obecne w większości żywych organizmów, katalizują konwersję O₂^{•-} do H₂O₂ ($2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) [Younus, 2018], co pozwala na kontrolę poziomu RFT. W związku z tym enzymy te pełnią zarówno rolę protekcyjną jak i wpływają na sygnalizację redoks (ang. redox signaling) [Wang *et al.*, 2018]. Komórki mające kontakt z tlenem są zwykle obfite w katalazę, znajdującą się przede wszystkim w peroksysomach. Katalizuje ona rozkład H₂O₂ do H₂O i O₂, dopełniając proces rozpoczęty przez SOD [Ighodaro & Akinloye, 2018]. Aktywność CAT uzupełniana jest przez aktywność GPx,

zlokalizowanej w mitochondriach, która również przekształca H_2O_2 do H_2O , wykorzystując w tym celu formę zredukowaną glutationu (GSH), który służy jako donor elektronów. Glutation jest jednym z najważniejszych narzędzi w arsenale systemu antyoksydacyjnego. Po przekształceniu do formy utlenionej (disulfid glutationu, ang. GSH disulfide, GSSG) przez GPx, glutation może zostać zregenerowany przez zależną od NADPH reduktazę glutationową (ang. glutathione reductase, GR) do GSH [Pangrazzi *et al.*, 2020]. Stosunek GSH/GSSG jest szeroko stosowanym wskaźnikiem obecności stresu oksydacyjnego [Jones, 2002]. Jednocześnie z byciem fundamentalną częścią systemu antyoksydacyjnego, GSH pełni szereg funkcji w OUN, od syntezy białek i aktywacji enzymów, poprzez transport metali i aminokwasów, aż po wpływ na różnicowanie neuronów i neurotransmisję [Iskusnykh *et al.*, 2022]. Nowe doniesienia wskazują również, że Nrf2 hamuje transkrypcję NOX [Kovac *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2022b] przyczyniając się tym samym do zmniejszenia generacji RFT. Nadmierne stężenie RFT wiąże się z uszkodzeniami lipidów, białek oraz DNA, co prowadzi do uszkodzeń komórkowych. Mózg, ze względu na bardzo wysokie zapotrzebowanie energetyczne oraz dużą zawartość lipidów, jest szczególnie wrażliwy na stres oksydacyjny [Cobley *et al.*, 2018].

Rośnie ilość doniesień dotyczących powiązań między ASD a stresem oksydacyjnym oraz obniżonym funkcjonowaniem systemu antyoksydacyjnego [Manivasagam *et al.*, 2020; Pangrazzi *et al.*, 2020]. Ślady stresu oksydacyjnego zaobserwowano w pobranych *post mortem* próbkach z mózgu osób z ASD, czemu towarzyszył zmniejszony stosunek GSH/GSSG, a także podwyższony poziom 3-nitrotyrozyny (3-NT, marker oksydacyjnego uszkodzenia białek), 3-chloro-l-tyrozyny (3-CT, powstaje w wyniku działania mieloperoksydazy (MPO), marker stanu zapalnego) oraz 8-okso-2'-deoksyguanozyny (8-oxo-dG, marker oksydacyjnego uszkodzenia DNA) [Rose *et al.*, 2012]. Co więcej, ślady zaburzeń antyoksydacyjnych oraz markery stresu oksydacyjnego obserwowano również we krwi dzieci z ASD [Abruzzo *et al.*, 2019; Pangrazzi *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021]. Badania na modelach zwierzęcych dostarczają dowodów na obecność zaburzeń redoks po prenatalnej ekspozycji na MIA. Lanté i wsp. wykazali iż podanie LPS w trakcie ciąży skutkowało wystąpieniem stresu oksydacyjnego w hipokampie płodów, zaobserwowano gwałtowny wzrost karbonylacji białek, a także spadek poziomu α - tokoferolu oraz stosunku GSH/GSSG. U potomstwa zaobserwowano zaburzenia behawioralne. Co ciekawe, jednoczesne podanie z LPS i antyoksydantu (N-acetylocysteiny) zapobiegało wystąpieniu stresu oksydacyjnego oraz znosiło zmiany behawioralne u zwierząt MIA [Lanté *et al.*,

2007]. W innym badaniu podanie LPS indukowało stres oksydacyjny oraz zwiększało ekspresję metaloproteinaz w płynie owodniowym oraz w mózgach płodów [Simões *et al.*, 2018].

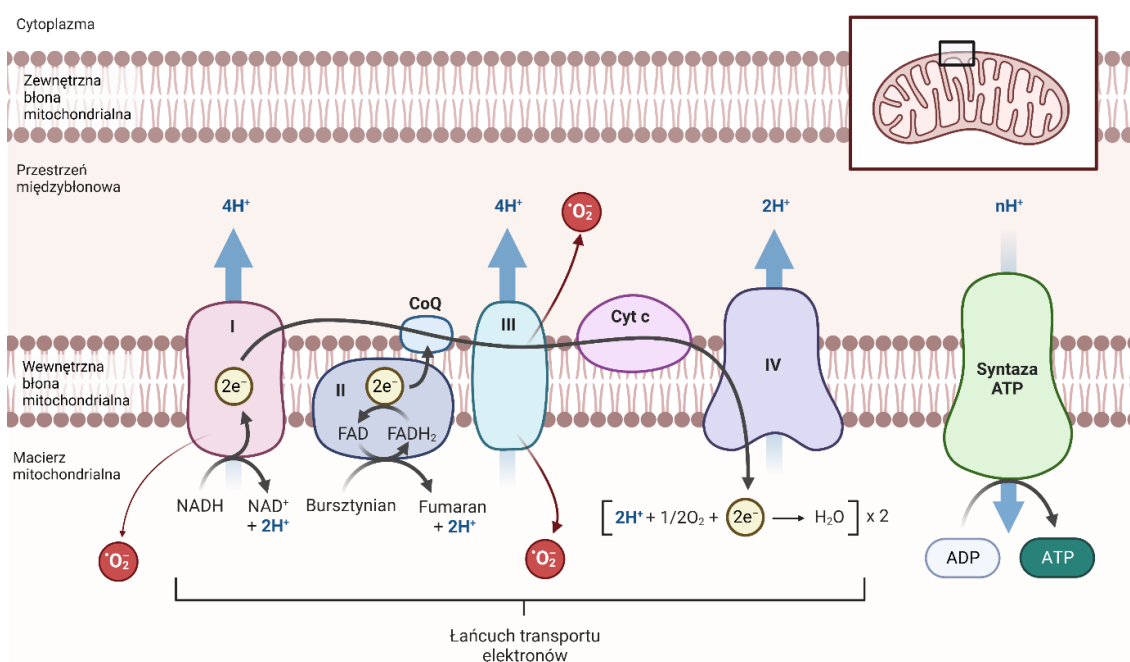
Jak wspomniano wyżej, stan zapalny oraz stres oksydacyjny są ściśle ze sobą powiązane, do tego stopnia iż mogą one wejść w tak zwane błędne koło (ang. vicious cycle), stymulując się wzajemnie. Wiadomym jest, że chroniczny stan zapalny wiąże się z obecnością stresu oksydacyjnego i procesów neurodegeneracyjnych, podczas gdy stres oksydacyjny indukuje rozwój stanu zapalnego [Pangrazzi *et al.*, 2020]. Wzrost poziomu cytokin prozapalnych oraz uwalnianie wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem (ang. damage-associated molecular patterns, DAMPs) indukuje fagocyty, makrofagi na obwodzie lub mikroglej w OUN do wybuchu tlenowego [Simpson & Oliver, 2020]. Co więcej, jak wspomniano wcześniej, RFT są zaangażowane w wiele szlaków sygnałowych i mogą wpływać na różne ścieżki molekularne, w tym ścieżki angażujące czynnik transkrypcyjny NF- κ B (ang. the nuclear factor kappa B) i kinazy aktywowane mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinases, MAPK) [Zhang *et al.*, 2016], co prowadzi do zwiększenia ekspresji cytokin prozapalnych, m.in. IL-1 β , IL-6, i TNF- α [Simpson & Oliver, 2020]. Nie dziwi więc, iż pobudzenie układu odpornościowego matki może skutkować zarówno stanem zapalnym jak i stresem oksydacyjnym u potomstwa, zarówno w życiu płodowym jak i później.

7.6. Funkcjonowanie mitochondriów w ośrodkowym układzie nerwowym

7.6.1. Udział mitochondriów w generacji wolnych rodników tlenowych

Mitochondria to organella zaangażowane w wiele różnych procesów komórkowych, jednak ich najważniejszym zadaniem pozostaje synteza ATP. Powstaje on w procesie fosforylacji oksydacyjnej, zachodzącej na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, z wykorzystaniem pomp protonowych [Papa *et al.*, 2012]. Wewnętrzna błona mitochondrialna charakteryzuje się wysoką nieprzepuszczalnością dla jonu H⁺, co pozwala na akumulację tego jonu w przestrzeni międzybłonowej. Jako pierwszą pompę protonową traktuje się łańcuch oddechowy - zespół enzymów oraz koenzymów, który dzięki transportowi elektronów z substratów (NADH, FADH₂) na tlen (O₂), zyskuje energię do przepompowywania jonów H⁺ do przestrzeni międzybłonowej [Papa *et al.*, 2012]. Drugą

pompą jest ATPaza, która w warunkach fizjologicznych pracuje w trybie odwróconym, jako syntaza ATP, syntezując ATP kosztem utworzonego w przestrzeni międzybłonowej elektrochemicznego potencjału protonowego. Łańcuch oddechowy składa się z czterech kompleksów mitochondrialnych, oksydoreduktazy NADH-ubichinon (CI), kompleksu dehydrogenazy bursztynianowej (CII), oksydoreduktazy ubichinol-cytochrom c (CIII) oraz oksydazy cytochromowej (CIV). W skład łańcucha wchodzi również koenzymy, koenzym Q (ubichinon) oraz cytochrom c [Wojtczak & Zablocki, 2008] (Rycina 4).



Rycina 4. Łańcuch transportu elektronów. Schematyczny przebieg łańcucha transportu elektronów. Kompleks I utlenia wewnątrzmitochondrialną pulę NADH, wprowadzając elektrony do łańcucha oddechowego i przekazując je na koenzym Q (CoQ). Przeniesieniu pary elektronów przez kompleks I z NADH na CoQ towarzyszy wypompowanie 4 protonów z macierzy do przestrzeni międzybłonowej. Kompleks II jako jedyny nie jest kanałem jonowym, przekazuje on na CoQ elektrony z bursztynianu przekształconego w fumaran. CoQ przenosi elektrony z kompleksów I i II na kompleks III, który przenosząc parę elektronów, jednocześnie wypompowuje 4 protony. Następnie cytochrom c (Cyt c) przenosi elektrony z kompleksu III na kompleks IV, czemu towarzyszy wypompowanie dwóch protonów. Droga elektronów przez łańcuch oddechowy kończy się neutralizacją dwóch protonów po stronie macierzy, gdzie łącząc się z O_2 tworzą one cząsteczkę wody. Syntaza ATP (kompleks V) to kanał jonowy, przepuszczający protony z powrotem do macierzy mitochondrialnej, wiąże się to ze zmianą konformacji kompleksu, co umożliwia dołączenie reszty kwasu fosforanowego (P_i) do cząsteczki ADP i wytworzenie ATP. Na czerwono zaznaczono miejsca powstawania anionorodnika nadadtlenkowego (O_2^-). Rycinę stworzono w programie BioRender.

Jak wspomniano wcześniej, transportowane przez łańcuch oddechowy elektrony w ostatnim etapie wykorzystywane są do redukcji atomu tlenu, który następnie wiąże się

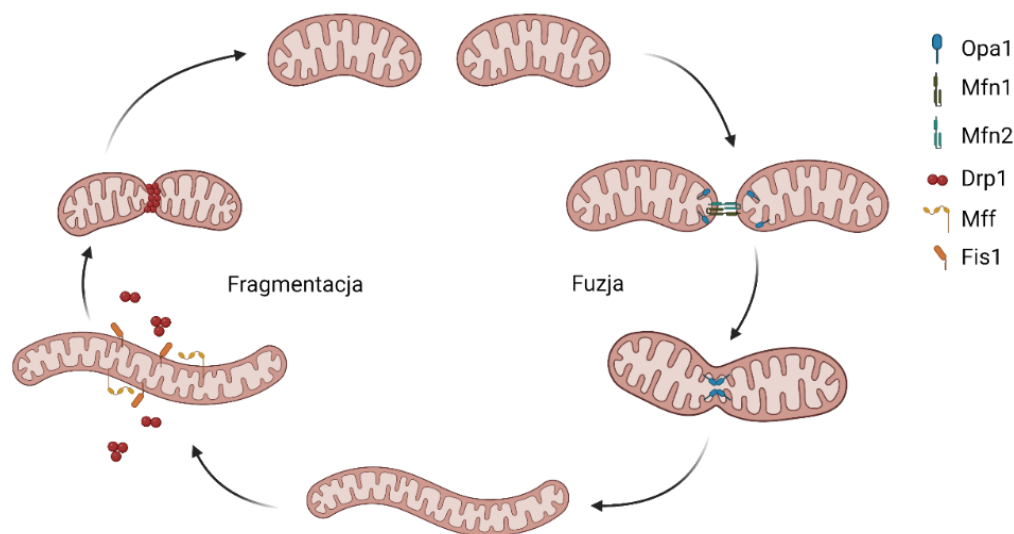
z dwoma jonami H^+ , co skutkuje powstaniem cząsteczki wody. Jednak niewielka część elektronów nie dociera do końca łańcucha, „uciekając” na jednym z wcześniejszych etapów. Elektrony takie reagują z tlenem cząsteczkowym, wytwarzając $O_2^{\bullet-}$. Przyjmuje się, iż takiej przemianie ulega około 1-2% pobieranego tlenu [Checa & Aran, 2020]. W ten sposób mitochondria stają się jednym z największych producentów RFT w komórce [Murphy, 2009], a za głównych winowajców uważa się kompleks I oraz kompleks III [Bleier & Dröse, 2013]. Istnieją inne miejsca produkcji RFT w mitochondriach, m.in. enzymy cyklu kwasu cytrynowego, np. akonitaza, dehydrogenaza pirogronianowa czy dehydrogenaza α -ketoglutaranowa, a także monoaminooksydaza (MAO) znajdująca się na zewnętrznej błonie mitochondriów [Angelova & Abramov, 2018]. Jednak najważniejsze komórkowe źródło RFT, to łańcuch oddechowy. Wysokie stężenie O_2 w mitochondriach w stanie spoczynku ($\sim 5-10\times$ wyższe niż w jądrze komórkowym czy cytosolu) sprawia, że mitochondria są narażone na uszkodzenia oksydacyjne, powodowane przez RFT pochodzące z łańcucha oddechowego [Ott *et al.*, 2007]. Jednocześnie, uszkodzone mitochondria produkują więcej RFT, co może prowadzić do wejścia w błędne koło, skutkujące generacją stresu oksydacyjnego [Andreyev *et al.*, 2005]. Mitochondria w OUN mogą zostać uszkodzone nie tylko na skutek lokalnej nadprodukcji RFT, ale również przez wolne rodniki produkowane przez inne źródła, a przede wszystkim przez RFT pochodzące z oksydaz NADPH, także mitochondrialne RFT aktywują oksydazy NADPH i prowadzą do większej produkcji RFT tworząc samonapędzające się toksyczne koło [Lee & Jose, 2021]. Aktywacja mikrogleju i uwalnianie prozapalnych cytokin stymuluje mitochondria do zwiększenia produkcji wolnych rodników i aktywacji stresu oksydacyjnego, co z kolei promuje rozwój procesów prozapalnych [West *et al.*, 2011]. Badania *in vitro* wykazały iż ekspozycja komórek mikrogleju na czynniki prozapalne prowadzi do wzrostu poziomu RFT oraz zaburzenia funkcji mitochondriów, zaobserwowano m.in. uszkodzenie mtDNA oraz zwiększenie fragmentacji tych organelli [Suematsu *et al.*, 2003; Voloboueva *et al.*, 2013; Doll *et al.*, 2015b; Park *et al.*, 2015; Nair *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2021]. W wyniku uszkodzenia mitochondriów dochodzi do uwalniania ATP, mtDNA, oraz mtRFT, które po uwolnieniu z mitochondriów funkcjonują jako DAMPs. Mitochondrialne DAMPs rozpoznawane są przez odpowiednie receptory [Grazioli & Pugin, 2018; Roh & Sohn, 2018], co skutkuje aktywacją odpowiedzi immunologicznej i stymuluje rozwój stanu zapalnego [Collins *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010].

7.6.2. Dynamika mitochondriów

Mitochondria to nieustannie zmieniające się, dynamiczne struktury, tworzące tak zwaną sieć mitochondrialną, której elementy łączą się i rozdzielają w procesach fuzji i fragmentacji [Sabouny & Shutt, 2020]. Fuzja pozwala na przekazywanie prawidłowego mtDNA między obszarami sieci, co przekłada się na optymalne funkcjonowanie mitochondriów nawet w obliczu uszkodzeń części mtDNA [Kawalec *et al.*, 2016], a także promuje syntezę ATP. Z kolei fragmentacja odpowiada za prawidłową dystrybucję i transport mitochondriów w komórce, szczególnie istotny dla komórek neuronalnych, o wydłużonym kształcie i znacznych odległościach pomiędzy ciałem komórki, a zakończeniami nerwowymi. Fragmentacja mitochondriów jest także kluczowym procesem kontroli jakości tych organelli, oddzielenie uszkodzonych nieprawidłowo funkcjonujących mitochondriów od sieci mitochondrialnej umożliwia ich usunięcie w procesie selektywnej autofagii czyli mitofagii, usprawniając funkcjonowanie całej sieci [Otera *et al.*, 2013]. Nawet niewielkie zaburzenie dynamiki mitochondriów (fuzji lub fragmentacji) może prowadzić do nieprawidłowości w strukturze drzewa dendrytycznego i zaburzeń plastyczności synaptycznej [Rossi & Pekkurnaz, 2019; Seager *et al.*, 2020]. Procesy fuzji i fragmentacji mitochondriów są ściśle kontrolowane przez grupę białek charakteryzujących się aktywnością GTPaz.

Proces fuzji mitochondriów przebiega dwuetapowo, rozpoczyna się od fuzji zewnętrznej błony mitochondrialnej (ang. outer-mitochondrial membrane, OMM), a następnie dochodzi do fuzji wewnętrznej błony mitochondrialnej (ang. inner-mitochondrial membrane, IMM). Za fuzję OMM odpowiadają mitofuzyna 1 (Mfn1) oraz mitofuzyna 2 (Mfn2). Mitofuzyny zakotwiczone są w błonie mitochondrialnej za pomocą domeny transbłonowej w taki sposób, iż oba ich końce, karboksylowy i aminowy skierowane są w stronę cytoplazmy [Kawalec *et al.*, 2016]. Proces fuzji rozpoczyna się od wytworzenia homo- (Mfn1-Mfn1 lub Mfn2-Mfn2) lub heterodimerów (Mfn1-Mfn2) między sąsiadującymi mitochondriami. Na końcu aminowym mitofuzyny znajduje się domena GTPazowa, która umożliwia hydrolizę GTP do GDP, przy czym Mfn1 wykazuje większą aktywność hydrolizy GTP niż Mfn2. Hydroliza GTP powoduje zmiany konformacyjne w OMM, prowadząc do destabilizacji błon i ostatecznie do ich fuzji [Partyka *et al.*, 2016]. Mfn1 oddziałuje także z białkiem Opa1 (ang. optic atrophy 1) odpowiedzialnym za fuzję IMM, koordynując tym samym fuzję zarówno OMM jak i IMM. Opa1 to zakotwiczone w IMM białko występujące w ośmiu izoformach, powstających na drodze modyfikacji

potranskrypcyjnych i potranslacyjnych. Proteoliza Opa1 dokonywana przez proteazy YME1L i OMA1 skutkuje wytworzeniem długich (ang. long-Opa1, L-Opa1) zakotwiczonych w błonie, i krótkich (ang. short-Opa1, S-Opa1) form białka [Pernas & Scorrano, 2016]. Forma L-Opa1 jest niezbędna dla zajścia fuzji IMM. Intensywne cięcie L-Opa1 i przewaga S-Opa1 sprzyja procesom fragmentacji [Ge *et al.*, 2020]. Proces fragmentacji mitochondriów jest zależny przede wszystkim od cytosolowego białka Drp1 (ang. dynamin-related protein 1) i jego modyfikacji potranslacyjnych (np. s-nitrozylacja, sumoilacja, czy fosforylacja reszty seryny 616 promuje fragmentację, podczas gdy zniesienie sumoilacji czy fosforylacja reszty seryny 637 powoduje zahamowanie fragmentacji) [Partyka *et al.*, 2016]. Rekrutacja Drp1 do mitochondriów zależna jest od zakotwiczonych w OMM białek adaptorowych, przede wszystkim Mff (ang. mitochondrial fission factor) oraz Fis1 (ang. mitochondrial fission protein 1). Drp1 w cytoplazmie przyjmuje postać dimerów lub tetramerów. Po zarekrutowaniu do mitochondrium, cząsteczki Drp1 łączą się w pierścień, który zaciskając się dokonuje fragmentacji [Pernas & Scorrano, 2016] (Rycina 5).



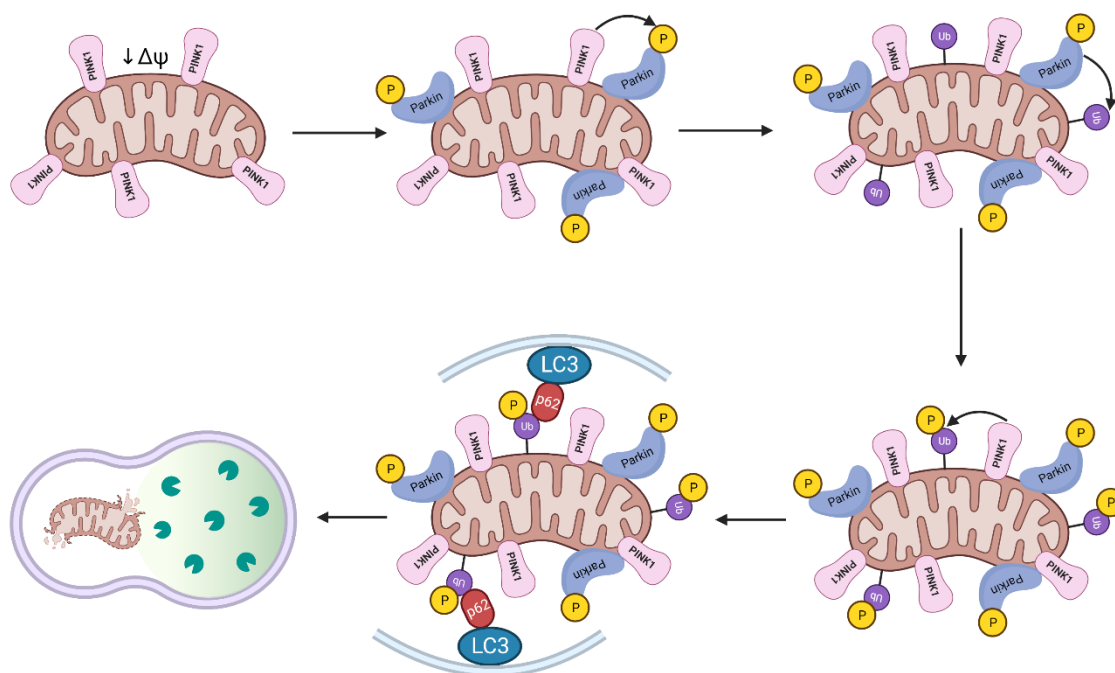
Rycina 5. Dynamika mitochondriów. Schematyczny przebieg procesów fuzji i fragmentacji mitochondriów. Fuzja skutkuje elongacją mitochondriów, podczas gdy fragmentacja dzieli mitochondria. Fuzja kontrolowana jest przez Mfn1 i Mfn2 w OMM oraz Opa1 w IMM. By zaśła fragmentacja, cytosolowe białko Drp1 rekrutowane jest do OMM, gdzie wiąże się do białek adaptorowych Mff i Fis1, tworząc pierścień, który zaciskając się dokonuje fragmentacji mitochondrium. Rycinę stworzono w programie BioRender.

7.6.3. Mitofagia i biogeneza mitochondriów

Autofagia jest niezbędnym dla utrzymania homeostazy komórkowej mechanizmem, umożliwiającym degradację składników cytoplazmatycznych, zarówno takich wytwarzanych w nadmiarze jak i нефункциональных lub uszkodzonych cząsteczek i organelli komórkowych. Proces ten jest czteroetapowy, składający się z kolejnych faz: indukcji (utworzenie błony izolującej czyli fagoforu), elongacji fagoforu (przekształcenie w autofagosom zawierający fragment cytoplazmy z elementami przeznaczonymi do usunięcia), fuzji autofagosomu z lizosomem (wytworzenie autofagolizosomu) oraz degradacji przez enzymy lizosomalne [Kasprowska-Liśkiewicz, 2017]. Wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje autofagii. Autofagia nieselektywna zachodzi gdy degradacji ulega część cytoplazmy ze znajdującymi się w niej różnorodnymi składnikami, w celu zachowania równowagi wielkości i składu cytoplazmatycznego. Trawienie konkretnego rodzaju struktur określa się jako autofagię selektywną. Do tej grupy należy mitofagia (ang. mitophagy), czyli degradacja mitochondriów [Gatica *et al.*, 2018].

Proces mitofagii odbywa się na drodze zależnej od receptorów lub od ubiwityny. Najlepiej poznanym u ssaków mechanizmem usuwania mitochondriów jest szlak zależny od ubiwityny,

w którym główną rolę pełni kinaza PINK1 (ang. PTEN-induced kinase 1) oraz ligaza ubikwitynowa E3 parkina [Lou *et al.*, 2020]. W warunkach fizjologicznych serynowo-treoninowa kinaza PINK1 jest transportowana przez błony mitochondrialne do przestrzeni międzybłonowej, gdzie jest degradowana przez proteazy PARL (ang. presenilin-associated rhomboid-like protein). Dlatego w spolaryzowanych prawidłowo funkcjonujących mitochondriach poziom PINK1 jest bardzo niski. W przypadku uszkodzenia mitochondrium i obniżenia potencjału błony mitochondrialnej dochodzi do aktywacji i akumulacji PINK1 na powierzchni OMM. Aktywna PINK1 fosforyluje i aktywuje znajdującą się w cytosolu parkinę, co powoduje rekrutację tego białka do uszkodzonego mitochondrium [Killackey *et al.*, 2020]. Aktywowana parkina, jako ligaza ubikwitynowa E3, katalizuje ubikwitynację wielu białek OMM, naznaczając je do degradacji w proteasomie. Obecność łańcuchów poliubikwitynowych na powierzchni mitochondrium prowadzi do rekrutacji kolejnych białek, odpowiadających za inicjację mitofagii, między innymi p62. Białko to, wiążące się do ubikwitynowanych białek, ma również zdolność do wiązania białka LC3, co prowadzi do rekrutacji autofagosomu [Youle & Narendra, 2011]. Po przyłączeniu białka LC3 dochodzi do zamknięcia mitochondrium w autofagosomie, który następnie łączy się z lizosomami, tworząc autofagolizosom gdzie następuje degradacja całych organelli [Onishi *et al.*, 2021].



Rycina 6. Schemat przebiegu mitofagii zależnej od PINK1/parkiny. W warunkach fizjologicznych PINK1 jest utrzymywane na niskim poziomie. Spadek potencjału błonowego mitochondrium ($\Delta\psi$) prowadzi do akumulacji PINK1 na powierzchni OMM. Kinaza PINK1 rekrutuje i aktywuje parkinę poprzez jej fosforylację (P) na Ser65. parkina z kolei ubikwitynuje (Ub) białka OMM. PINK1 fosforyluje Ub na białkach OMM, co dodatkowo aktywuje parkinę. Białka adaptorowe (w tym p62) wiążą zarówno Ub jak i białko LC3 związane z błoną autofagosomu. Powstały autofagosom łączy się z lizosomem, gdzie mitochondrium degradowane jest przez hydrolazy lizosomalne (zielony) [Rüb *et al.*, 2017]. Rycinę stworzono w programie BioRender.

Za utrzymywanie puli prawidłowo funkcjonujących mitochondriów odpowiada również proces biogenezy mitochondriów. Nowe mitochondria mogą powstawać jedynie z już istniejących organelli. Zwiększenie zapotrzebowania energetycznego indukuje skomplikowany proces, angażujący zarówno genom jądrowy jak i mitochondrialny, w wyniku którego dochodzi do ekspresji ponad 1100 białek [Jamwal *et al.*, 2021]. Jako iż genom mitochondrialny koduje jedynie 37 białek, większość procesu biogenezy przebiega pod kontrolą genomu jądrowego. Głównym czynnikiem transkrypcyjnym kontrolującym biogenezę mitochondriów jest koaktywator-1 α receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (ang. the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC1 α). PGC1 α wpływa na ekspresję wielu białek zaangażowanych w regulację metabolizmu komórkowego. Wykazano, iż PGC1 α w istocie nie posiada aktywności enzymatycznej ani domeny wiążącej DNA. Zamiast tego, białko to oddziałuje na inne czynniki transkrypcyjne, zwiększając ich ekspresję i pośrednio wpływając na

ekspresję genów związanych z dostosowaniem się komórki do zmieniających się warunków [Miller *et al.*, 2019]. PGC1 α wpływa zarówno na biogenezę mitochondriów, jak i na inne funkcje tych organelli, między innymi dynamikę, wpływając na Mfn2 i Drp1 oraz mitofagię, poprzez wpływ na PINK1 i parkinę [Chen *et al.*, 2022]. W przebiegu biogenezy PGC1 α aktywuje białka NRF1 i NRF2 (ang. nuclear respiratory factors 1 i 2). Białka te nie tylko aktywują transkrypcyjny czynnik mitochondrialny A (ang. mitochondrial transcription factor A, Tfam), ale również wiążą się do regionów promotorowych genów jądrowych kodujących podjednostki pięciu kompleksów mitochondrialnych łańcucha transportu elektronów, regulują także geny zaangażowane w biosyntezę hemu, import kodowanych jądrowo białek mitochondrialnych oraz replikację i transkrypcję mtDNA [Li *et al.*, 2017]. Tfam to jądrowo kodowane białko, syntetyzowane w cytoplazmie, a następnie importowane do wnętrza mitochondriów [Kang *et al.*, 2018]. Na terenie mitochondrium Tfam wpływa bezpośrednio na transkrypcję i replikację mtDNA [Jornayvaz & Shulman, 2010].

7.6.4. Mitochondria w zaburzeniach ze spektrum autyzmu

Prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów jest kluczowe dla zachowania funkcji neuronów, które są komórkami o bardzo dużej aktywności i wysokim zapotrzebowaniu energetycznym. Mózg ludzki stanowiąc tylko 2% masy całego ciała zużywa aż 20% energii [Raichle, 2010]. Wysokie zapotrzebowania energetyczne neuronów wynikają m.in. z konieczności utrzymania i przywrócenia gradientów jonowych, które zmieniają się podczas sygnalizacji neuronalnej, także wychwyt i recykling neuroprzekazników jest procesem wymagającym pod względem energetycznym [Bélanger *et al.*, 2011]. Prawidłowo funkcjonujące mitochondria są również niezbędne do utrzymania struktury drzewa dendrytycznego oraz biorą udział w regulacji homeostazy jonów wapnia, szczególnie w zakończeniach synaptycznych. Zaburzenia energetyczne i mitochondrialne pełnią istotną rolę w patomechanizmie wielu chorób układu nerwowego, przede wszystkim w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, czy Parkinsona [Perez Ortiz & Swerdlow, 2019; Rani & Mondal, 2020]. Badania ostatnich lat wskazują również na zaburzenia bioenergetyczne oraz nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów u pacjentów z ASD. Około 4% osób z ASD jest diagnozowanych pod kątem chorób mitochondrialnych (ang. classic mitochondrial disease, MD). Jednakże, różnorakie przejawy zaburzeń mitochondrialnych obserwuje się nawet u 80% pacjentów z autyzmem

[Frye, 2020]. Wykazano między innymi zaburzenia ekspresji [Anitha *et al.*, 2013], poziomu [Chauhan *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2013b] oraz aktywności podjednostek kompleksów łańcucha transportu elektronów [Gu *et al.*, 2013] w mózgu osób z ASD. Zaobserwowano również zaburzenia ekspresji genów zaangażowanych w transport mitochondrialny, utrzymywanie potencjału błonowego oraz dynamikę mitochondriów (fuzję i fragmentację) [Anitha *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013b]. Wydaje się zatem, że zaburzenia mitochondrialne są istotne w kontekście ASD. Mimo to, niewiele jest dostępnych danych dotyczących funkcjonowania mitochondriów w mózgu potomstwa matek narażonych na infekcje w ciąży.

8. Założenia i cel pracy

Zaburzenia ze spektrum autyzmu (ang. autism spectrum disorders, ASD), należące do często występujących zaburzeń neurorozwojowych, dotyczą ponad 1% populacji dzieci na świecie. Jednocześnie, z roku na rok obserwuje się coraz większą liczbę diagnozowanych przypadków autyzmu [Rice *et al.*, 2007; Maenner *et al.*, 2020]. Etiologia ASD pozostaje nieznana, jednak badania ostatnich lat sugerują, że jednym z czynników zwiększających ryzyko wystąpienia ASD u dziecka jest aktywacja układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży (ang. maternal immune activation, MIA) [Boulanger-Bertolus *et al.*, 2018]. Wśród opracowanych w ostatnich latach modeli MIA, jednym z najczęściej wykorzystywanych jest zwierzęcy model aktywacji układu odpornościowego matki oparty na dootrzewnowej iniekcji ciężarnym samicom endotoksyny bakteryjnej, lipopolisacharydu (LPS). Potomstwo MIA wykazuje liczne zachowania rekapitulujące typowe dla autyzmu zaburzenia u ludzi. Co więcej, zaobserwowano u niego m.in. zmiany w budowie i funkcjonowaniu mózgu [Canetta *et al.*, 2016; Rahman *et al.*, 2017; Antonson *et al.*, 2018], a także obecność markerów stanu zapalnego [Garay *et al.*, 2013]. Do tej pory brakowało jednak informacji o dokładnych efektach MIA na stan mitochondriów w mózgu potomstwa, choć zaburzenia mitochondrialne są coraz częściej diagnozowane u pacjentów z autyzmem [Frye, 2020]. Mając na uwadze powyższe oraz kluczowe znaczenie wydajności mitochondriów dla prawidłowego funkcjonowania mózgu nie tylko w życiu płodowym, ale i w późniejszych etapach rozwoju, celem badań była weryfikacja hipotezy, iż w zaburzeniach ze spektrum autyzmu wywołanych aktywacją układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży dochodzi do nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów i zaburzeń metabolizmu energetycznego w mózgu. Zaburzenia mitochondrialne wywołane infekcjami matki w ciąży mogą leżeć u podstaw zaburzeń synaptycznych i rozwoju autyzmu. Dlatego cele szczegółowe obejmowały:

- 1) Zbadanie wpływu aktywacji układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży na strukturę i funkcjonowanie mitochondriów w mózgu osesków oraz młodego potomstwa, w tym na funkcjonowanie łańcucha transportu elektronów, dynamikę oraz biogenezę i usuwanie mitochondriów na drodze autofagii;
- 2) Analizę procesów prozapalnych i markerów stresu oksydacyjnego w mózgu osesków oraz młodych zwierząt w odpowiedzi na stres prenatalny wywołany aktywacją układu odpornościowego matki w ciąży;
- 3) Zbadanie wpływu aktywacji układu odpornościowego matki na związane z autyzmem zachowania osesków oraz młodych zwierząt potomnych;

9. Materiały i metody

9.1. Zwierzęta doświadczalne i model aktywacji układu odpornościowego matki w ciąży (MIA)

9.1.1. Zwierzęta doświadczalne

Eksperymenty na zwierzętach przeprowadzono na podstawie zezwoleń nr. 361/2017 oraz nr. WAW2/053/2021 wystawionych przez I Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie przy ścisłym zachowaniu wytycznych Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach. Osoby biorące udział w doświadczeniach posiadały adekwatne zezwolenia.

Badania prowadzono z wykorzystaniem szczurów stada Wistar, dostarczonych przez zwierzętarnię Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN i utrzymywanych tamże. Ze zwierzętarni pobierano ciężarne samice między 12 a 15 tygodniem życia, ważące 210-250 g. Zwierzęta przetrzymywane były w warunkach kontrolowanej temperatury i wilgotności, w cyklu 12 h światła/12 h ciemności. W trakcie trwania eksperymentu zwierzęta przebywały w klatkach hodowlanych (425 mm x 266 mm x 185 mm, powierzchnia podłogi 800cm², Rycina 7), gdzie zapewniony miały nieograniczony dostęp do pokarmu i wody oraz wzbogacone środowisko (plastikowe schronienia, długie wióry, klocki drewniane).



Rycina 7. Klatka hodowlana. Zdjęcie poglądowe klatki hodowlanej, widoczne wzbogacenia środowiska. W klatce znajdują się dwa samce szczura stada Wistar, z grupy kontrolnej.

9.1.2. Model MIA

Aktywację układu odpornościowego matki (MIA) wywoływano poprzez jednorazowe dootrzewnowe podanie lipopolisacharydu (LPS) z *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, USA; serotyp 055:B5, toksyczność: 500000 j./mg) w dawce 100 µg/kg masy ciała, w 9,5 dniu ciąży (t.j. o godzinie 12:00 w południe, 9 dnia ciąży). Kontrole otrzymywały analogiczną iniekcję z rozpuszczalnikiem (sterylna sól fizjologiczna, 0,9%). Objawy chorobowe u wybranych matek były monitorowane przez 24 h po podaniu LPS z pomocą klatek metabolicznych (Tecniplast S.p.A., Włochy). Analizowano zmiany w masie i temperaturze ciała (mierzonej rektalnie, termometr Fine Science Tool TR-200) oraz pobieranie pokarmu i wody. Co więcej, samice obserwowano pod kątem zmian w behawiorze (letargiczność, półprzymknięcie oczu, zmniejszenie aktywności). Część samic poddawano eutanazji w 24 h po iniekcji w celu pobrania płodów i łożysk do dalszych analiz. Pozostałe samice po iniekcji przetrzymywane były samotnie w klatkach aż do porodu. Dzień porodu zapisywano jako pierwszy dzień życia. W 7 dniu mioty standaryzowano (losowa selekcja) do 10 sztuk w miocie. Dodatkowo, w 7 dniu życia wybrane mioty poddawano eutanazji w celu wykorzystania mózgu do dalszych analiz. W dniach 9-11 przeprowadzano test izolacji od matki, a w 15 dniu życia test preferencji ściółki. W 22 dniu życia młode oddzielano od matek i umieszczano w osobnych klatkach po 3-4 sztuki. Matki poddawano eutanazji. By uniknąć wpływu zmian hormonalnych, do dalszych analiz wykorzystywano wyłącznie

same. W okolicach 40 i 50 dnia życia przeprowadzano test otwartego pola i trójkomorowy test socjalizacji. Młode samce poddawano eutanazji w 52-54 dniu życia, pobierano mózgi, a następnie do dalszych badań wykorzystywano korę mózgu oraz hipokamp.

9.1.3. Eutanazja zwierząt i izolacja struktur mózgu

Eutanazję prowadzono w sposób szybki i jak najbardziej ograniczający stres zwierzęcia. Zwierzęta usypiano poprzez wziewne podanie izofluranu (Iso-Vet), a następnie dekapitowano przy użyciu gilotyny. Przed dekapitacją części zwierząt pobierano krew do dalszych analiz. Mózg izolowano w całości i umieszczano w zimnym 0,1 M buforowanym roztworze soli fizjologicznej pH 7,4 (ang. phosphate-buffered saline, PBS, Sigma Aldrich, USA). Następnie mózg rozdzielano na struktury na szalce Petriego. Tkanki które nie były wykorzystywane na świeżo, natychmiast mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C. Do dalszych badań wykorzystywano korę mózgu oraz hipokamp.

9.2. Izolacja mitochondriów

Izolację mitochondriów przeprowadzano z pomocą gotowego komercyjnego zestawu do izolacji (Mitochondrial Isolation kit, Sigma-Aldrich, USA). Świeżo-pobrą tkankę homogenizowano w buforze do ekstrakcji (10 mM HEPES, 200 mM mannitol, 70 mM sacharoza, 1 mM EGTA, pH 7,5) i wirowano naprzemiennie na niskich ($600 \times g/5 \text{ min}/4^\circ\text{C}$) i wysokich ($11,000 \times g/10 \text{ min}/4^\circ\text{C}$) obrotach. Wyizolowane mitochondria zawieszano w 40 μl buforu do przechowywania (10 mM HEPES, 250 mM sacharoza, 1 mM ATP, 80 μM ADP, 5 mM bursztynian sodu, 2 mM K_2HPO_4 , 1 mM DTT (ditiotreititol), pH 7,5) i wykorzystywano bezpośrednio do analiz.

9.3. Analiza poziomu ekspresji genów

9.3.1. Izolacja RNA

Całkowity kwas rybonukleinowy (RNA) izolowano za pomocą zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego [Chomczynski & Sacchi, 1987], z użyciem odczynnika TRI Reagent (Sigma-Aldrich, USA). Wszystkie używane przyrządy były przeznaczone do pracy z RNA (wolne od rybonukleaz, ang. RNase-free). 50 mg tkanki umieszczano w probówce 1,5 ml typu Eppendorf, zalewano 1 ml TRI Reagent'u i homogenizowano z wykorzystaniem strzykawki 2 ml i igły rozmiar 6 (średnica 0,6 mm). Następnie próby

inkubowano 5 min w temperaturze pokojowej (ang. room temperature, R.T.), po czym dodawano 200 μ l chloroformu, mieszano i inkubowano 3 min w R.T. Próbki wirowano (12 000 x g/15 min/4°C), a fazę wodną przenoszono do nowej probówki. Następnie dodawano 500 μ l izopropanolu, inkubowano 10 min w R.T. i wirowano (12 000 x g/ 10 min/4°C), po wirowaniu zlewano supernatant, a osad RNA zalewano 1 ml 75% etanolu (EtOH). Próby mieszano i wirowano (7500 x g/5 min/4°C), a następnie ponownie zalewano EtOH (ostatnie trzy kroki powtarzano trzykrotnie). Po końcowym wirowaniu EtOH odlewano, a osad pozostawiano do wysuszenia. Po wysuszeniu RNA zawieszano w 20 μ l ultraczystej wody (UltraPure Distilled Water, Invitrogen, USA).

Pomiar ilości wyizolowanego RNA dokonywano metodą spektrofotometryczną ($\lambda = 260$ nm) z pomocą aparatu NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Otrzymane RNA rozcieńczano do stężenia 125 ng/ μ l a następnie w celu oczyszczenia, przeprowadzano reakcję trawienia DNA z użyciem komercyjnego zestawu (DNase I, Sigma Aldrich, USA). Do 8 μ l rozcieńczonego RNA (1 μ g RNA) dodawano 2 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej enzym (DNAza, ang. amplification grade DNase I). Następnie mieszaninę umieszczano w termocyklerze (Mastercycler nexus gradient, Eppendorf, Niemcy) w 25°C/15 min. Po tym czasie dodawano 1 μ l odczynnika inaktywującego DNAzę (ang. Stop solution) i inkubowano w 70°C/10 min. Po zakończonej reakcji próbki przechowywano w lodzie.

9.3.2. Odwrotna transkrypcja

Proces odwrotnej transkrypcji opiera się na syntezie cDNA (komplementarnego DNA, ang. complementary DNA) na matrycy RNA przez odwrotną transkryptazę (EC 2.7.7.49). Reakcję przeprowadzano z użyciem komercyjnego zestawu (High capacity RNA-to-cDNA Kit, Applied Biosystems, USA). Po dodaniu odpowiedniej ilości mieszaniny reakcyjnej (9 μ l), próby inkubowano w termocyklerze (Mastercycler nexus gradient, Eppendorf, Niemcy) w zmiennej temperaturze: 25°C/10 min; 37°C/120 min; 85°C/5 min. Końcowa objętość próbki wynosiła 20 μ l. Przed analizą próby rozcieńczano 5-krotnie.

9.3.3. Analiza ilościowa ekspresji mRNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym

Zmiany poziomu mRNA badano za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. quantitative real-time PCR, qRT-PCR). Na matrycy cDNA uzyskanej

z 1 μ g RNA przeprowadzano reakcję qRT-PCR z zastosowaniem systemu TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, USA), przy użyciu sond TaqMan (Tabela I).

Reakcję prowadzono w trzech powtórzeniach dla każdej próbki, w warunkach 50°C/2 min; 95°C/10 min; a następnie 40 cykli amplifikacji (95°C/15 s; 60°C/1 min), przy pomocy aparatu ABI PRISM 7500 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, USA). Względną zmianę poziomu mRNA obliczano metodą $\Delta\Delta C_t$ odnosząc się do genu referencyjnego (*Actb*).

Tabela I. Wykorzystywane sondy TaqMan.

Symbol genu	Nazwa	Numer referencyjny
<i>Actb</i>	β -aktyna	Rn00667869_m1
<i>Il6</i>	IL-6	Rn01410339-m1
<i>Tnf</i>	TNF α	Rn01525859_g1
<i>Ifng</i>	IFN γ	Rn00594078_m1
<i>Il1b</i>	IL-1 β	Rn00580432_m1
<i>Nox1</i>	Oksydaza NADPH 1	Rn00586652
<i>Cybb</i>	Oksydaza NADPH 2	Rn00576710
<i>Nox4</i>	Oksydaza NADPH 4	Rn00585380
<i>mt-Nd1</i>	Podjednostka kompleksu I (oksydoreduktazy NADH-koenzym Q)	Rn03296764_s1
<i>mt-Sdha</i>	Podjednostka kompleksu II (oksydoreduktazy bursztynian-ubichinon)	Rn00590475_m1
<i>mt-Cyb</i>	Podjednostka kompleksu III (oksydoreduktazy koenzym Q-cytochrom C)	Rn03296746_s1
<i>mt-Co1</i>	Podjednostka kompleksu IV (oksydazy cytochromu C)	Rn03296721_s1
<i>Sod1</i>	Dysmutaza ponadtlenkowa 1	Rn00566938_m1
<i>Sod2</i>	Dysmutaza ponadtlenkowa 2	Rn00566942_g1
<i>Cat</i>	Katalaza	Rn00560930_m1
<i>Gpx1</i>	Peroksydaza glutationowa 1	Rn00577994_g1
<i>Gpx4</i>	Peroksydaza glutationowa 4	Rn00820818_g1
<i>Mfn1</i>	Mitofuzyna 1	Rn00594496
<i>Mfn2</i>	Mitofuzyna 2	Rn00500120
<i>Opa1</i>	OPA1	Rn00592200
<i>Dnm1l</i>	Drp1	Rn00586466
<i>Fis1</i>	FIS1	Rn01480911
<i>Ppargc1</i>	Pgc1 α	Rn00580241
<i>Nrf1</i>	NRF1	Rn01455958
<i>Tfam</i>	TFAM	Rn00580051

9.4. Metody spektrofotometryczne

9.4.1. Oznaczanie poziomu białka

Poziom białka oznaczano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, USA), zgodnie z instrukcją producenta. Procedurę rozpoczynano przez przygotowanie standardu, zawierającego określone rozcieńczenia albuminy (odpowiednio 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 i 0 µg/ml), co pozwalało na uzyskanie krzywej wzorcowej. Następnie przygotowywano odczynnik reakcyjny (ang. working reagent, WR) po 200 µl na próbę. Próby odpowiednio rozcieńczano (w przypadku homogenatu z pełnej tkanki 20x, izolowane mitochondria 15x) i nakładano po 25 µl na płytkę 96-dołkową, w dwóch powtórzeniach. Następnie próby inkubowano z WR przez 30 minut w 37°C, w ciemności. Pomiar absorbancji wykonywano na czytniku Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific, USA), $\lambda = 562$ nm.

9.4.2. Pomiar aktywności oksydazy NADPH (NOX)

Aktywność NOX mierzono na podstawie metody opracowanej przez Shpungin i wsp. [Shpungin *et al.*, 1989]. Metoda ta opiera się na pomiarze powstawania $O_2^{\bullet-}$ w próbce, w obecności NADPH będącego substratem dla oksydazy NADPH. Pomiar przyrostu $O_2^{\bullet-}$ mierzony był za pomocą redukcji cytochromu c. W obecności $O_2^{\bullet-}$ dochodzi do redukcji ferricytochromu c, a stężenie zredukowanej formy cytochromu c (ferrocytochrom c) jest zależne od stężenia $O_2^{\bullet-}$ i wiąże się ze zmianą absorbancji przy długości fali 550 nm.

Próby homogenizowano na lodzie w buforze PBS (pH 7,4) do uzyskania 5% homogenatów. Mieszanina reakcyjna zawierała 100 mM bufor fosforanowy (NaH_2PO_4/K_2HPO_4), 1 mM SDS (laurylosiarczan sodu, ang. sodium dodecyl sulfate) 1 mM cytochrom c i 1 mM FAD. Przed dodaniem cytochromu c do mieszaniny reakcyjnej, inkubowano go z DTT (100 mM) przez 20 min w ciemności. Reakcję rozpoczynano poprzez dodanie NADPH (2 mM). Aktywność enzymu mierzono w obecności i przy braku inhibitora oksydazy NADPH (apocynina, 100 mM w DMSO (dimetylosulfotlenek)). Do próbek bez inhibitora dodawano DMSO by wykluczyć wpływ nośnika. Pomiar absorbancji przy długości fali 550 nm prowadzono na czytniku Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific, USA), w dwóch powtórzeniach. Aktywność enzymu określano na podstawie różnicy między pomiarem z inhibitorem a pomiarem bez inhibitora, w wybranym punkcie czasowym.

9.4.3. Analiza poziomu glutationu

Poziom utlenionej (GSSG) i zredukowanej (GSH) formy glutationu, jak również całkowita jego zawartość w próbach, mierzone były z pomocą komercyjnego zestawu (Glutathione Assay Kit, Cayman Chemical, USA), zgodnie z zaleceniami producenta. Działanie użytego zestawu opiera się na spektrofotometrycznej metodzie oznaczania niebiałkowych grup sulfhydrylowych (-SH), w której kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy) (DTNB, odczynnik Ellmana) jest redukowany przez związki tiolowe, czemu towarzyszy powstawanie barwnego kwasu 2-nitro-5-merkaptobenzoesowego. Tkanekę homogenizowano w zimnym buforze (50 mM MES (kwas 2-(N-morfolino)-etanosulfonowy), pH 7; 1 mM EDTA (kwas wersenowy, ang. ethylenediaminetetraacetic acid)) i wirowano ($10,000 \times g/15 \text{ min}/4^{\circ}\text{C}$). Po zakończonym wirowaniu mierzono poziom białek w uzyskanym supernatancie, który następnie odbiałczano. Do pomiaru poziomu samego GSSG, próby dodatkowo inkubowano przez 60 min z 1 M roztworem 2-winylopirydyny w etanolu w celu derywatywacji GSH. Na płytkę 96-dołkową nakładano po 50 μl próby, w dwóch powtórzeniach. Następnie na świeżo przygotowywano mieszaninę reakcyjną (bufor MES, mieszanina kofaktorów, mieszanina enzymów, H_2O , DTNB), który dodawano do prób (po 150 μl) w ciągu 10 minut od przygotowania. Zmiany absorbancji mierzono z pomocą czytnika Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific, USA), $\lambda = 405\text{nm}$, po 25 minutach inkubacji w ciemności.

9.4.4. Pomiar aktywności kompleksów mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów

9.4.4.1. Aktywność kompleksu I

Pomiar aktywności mitochondrialnego kompleksu I przeprowadzano z użyciem komercyjnego zestawu (Complex I Enzyme Activity Microplate Assay Kit, Abcam, Wielka Brytania), zgodnie z zaleceniami producenta. Aktywność enzymu określano poprzez pomiar utlenienia NADH do NAD^+ , czemu towarzyszyła zmiana absorbancji mieszaniny reakcyjnej. Tkanekę homogenizowano w buforze PBS (pH 7,4) z wykorzystaniem strzykawki 2 ml i igły rozmiar 6, następnie mierzono poziom białka w próbach i odpowiednio je rozcieńczano. Na dostarczoną przez producenta płytkę pokrytą unieruchomionym przeciwciałem nakładano 50 μg białka z homogenatu. Próby inkubowano przez 3 h w R.T. Po tym czasie płytkę trzykrotnie płukano i zalewano mieszaniną reakcyjną (bufor (Dilution Buffer), NADH, barwnik), a następnie dokonywano

pomiaru z użyciem czytnika Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific, USA), całkowity czas pomiaru 30 min, odczyt co 1 min, $\lambda = 450$ nm. Każdą z prób mierzono w dwóch powtórzeniach.

9.4.4.2. Aktywność kompleksu II

Pomiar aktywności mitochondrialnego kompleksu II przeprowadzano z użyciem komercyjnego zestawu (Complex II Enzyme Activity Microplate Assay Kit, Abcam, Wielka Brytania), zgodnie z zaleceniami producenta. Aktywność enzymu określano poprzez pomiar produkcji ubichinolu (przez redukcję ubichinonu), co wiązało się ze spadkiem absorbancji mieszaniny reakcyjnej. Tkanę homogenizowano w buforze PBS (pH 7,4) z wykorzystaniem strzykawki 2 ml i igły rozmiar 6, następnie mierzono poziom białka w próbach i odpowiednio je rozcieńczano. Na dostarczoną przez producenta płytkę pokrytą unieruchomionym przeciwciałem nakładano 50 μ g białka z homogenatu. Próby inkubowano przez 2 h w R.T. Po tym czasie płytkę trzykrotnie płukano i zalewano 40 μ l mieszaniny lipidów (odczynnik Lipid Mix), po czym inkubowano przez 30min w R.T. Po zakończonej inkubacji do każdego dołka dodawano 200 μ L mieszaniny reakcyjnej (ubichinon, bursztynian, barwnik (DCPIP, 2,6-dichlorophenolindophenol), bufor (Complex II Activity Buffer)), a następnie dokonywano pomiaru z użyciem czytnika Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific, USA), całkowity czas pomiaru 60 min, odczyt co 20 s, $\lambda = 600$ nm. Każdą z prób mierzono w dwóch powtórzeniach.

9.4.4.3. Aktywność kompleksu III

Pomiar aktywności mitochondrialnego kompleksu III przeprowadzano z użyciem komercyjnego zestawu (Mitochondrial Complex III Activity Assay Kit, Sigma-Aldrich, USA), zgodnie z zaleceniami producenta. Aktywność enzymu określano poprzez pomiar redukcji cytochromu c czemu towarzyszyła zmiana absorbancji mieszaniny reakcyjnej. Mitochondria izolowano, a następnie odpowiednio rozcieńczano. Na płytkę 96-dołkową o zmniejszonej o połowę powierzchni dna dołka (ang. half-area plate) nakładano odpowiednio: do połowy dołków samą mieszaninę reakcyjną (Sample Mix; bufor (Complex III Assay Buffer), DMSO), do pozostałych mieszaninę reakcyjną z inhibitorem (antymycyna A w DMSO). Następnie nakładano rozcieńczone mitochondria (po 10 μ g białka). Reakcję rozpoczynano przez dodanie substratu (cytochrom c) i natychmiast rozpoczynano pomiar z użyciem czytnika Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific, USA),

całkowity czas pomiaru 10 min, odczyt co 30 s, $\lambda = 550$ nm. Każdą z prób mierzono w dwóch powtórzeniach.

9.4.4.4. Aktywność kompleksu IV

Pomiar aktywności mitochondrialnego kompleksu IV przeprowadzano z użyciem komercyjnego zestawu (Complex IV Rodent Enzyme Activity Microplate Assay Kit, Abcam, Wielka Brytania) zgodnie z zaleceniami producenta. Aktywność enzymu określano poprzez pomiar utleniania cytochromu c czemu towarzyszyła zmiana absorbancji mieszaniny reakcyjnej. Tkankę homogenizowano w buforze dostarczonym w zestawie (Solution 1) z wykorzystaniem strzykawki 2 ml i igły rozmiar 6, następnie mierzono poziom białka w próbach i odpowiednio je rozcieńczano. Na dostarczoną przez producenta płytkę pokrytą unieruchomionym przeciwciałem nakładano 50 μ g białka z homogenatu. Próby inkubowano przez 3 h w R.T. Po tym czasie płytkę trzykrotnie płukano i nakładano po 200 μ l mieszaniny reakcyjnej (zredukowany cytochrom c w Solution 1) i natychmiast rozpoczynano pomiar z użyciem czytnika Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific, USA), całkowity czas pomiaru 120 min, odczyt co 1 min, 30°C, $\lambda = 550$ nm. Każdą z prób mierzono w dwóch powtórzeniach.

9.4.5. Pomiar aktywności syntazy cytrynianowej

Aktywność syntazy cytrynianowej mierzono z użyciem komercyjnego zestawu (MitoCheck® Citrate Synthase Activity Assay Kit, Cayman Chemical, USA), zgodnie z zaleceniami producenta. Syntaza cytrynianowa katalizuje reakcję kondensacji acetylo-CoA i szczawiooctanu, z wytworzeniem koenzymu-A (CoA) i cytrynianu. Aktywność enzymu mierzono na podstawie przyrostu CoA, co wiązało się ze zmianą absorbancji mieszaniny reakcyjnej. Tkankę homogenizowano w buforze PBS (pH 7,4) z wykorzystaniem strzykawki 2 ml i igły rozmiar 6. Na płytkę 96-dołkową nakładano po 50 μ l mieszaniny A (Acetylo-CoA, reagent wywołujący, bufor reakcyjny), a następnie dodawano rozcieńczone próby (1:200 w buforze reakcyjnym, 30 μ l). Reakcję rozpoczynało dodanie 20 μ l mieszaniny B (szczawiooctan, bufor reakcyjny). Pomiar przeprowadzano natychmiast, z pomocą czytnika Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific, USA), $\lambda = 412$ nm. Każdą z prób mierzono w dwóch powtórzeniach.

9.5. Metody immunochemiczne

9.5.1. Immunochemiczna detekcja białek metodą Western blot

9.5.1.1. Elektroforetyczny rozdział białek oraz transfer na membranę nitrocelulozową

Odmierzano odpowiednią ilość wstępnie zhomogenizowanej tkanki lub izolowanych mitochondriów i umieszczano w probówce typu Eppendorf, a następnie zalewano wyliczoną objętością 5-krotnie stężonego buforu obciążającego (ang. Sample Buffer Laemmli, SB) by uzyskać 2,5% homogenat. Tkanekę ponownie homogenizowano w SB z wykorzystaniem strzykawki 2 ml i igły rozmiar 6. Tak przygotowane próby poddawano denaturacji termicznej w 95°C/5 min, po czym nakładano (w ilości 20, 40 lub 60 µg białka) na żel poliakrylamidowy. Wykorzystywano żele 10% oraz 15%, w zależności od wielkości badanych białek. Rozdział elektroforetyczny białek (ang. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) prowadzono w buforze do elektroforezy (Tabela II) w aparacie firmy Bio-Rad (Bio-Rad, USA). By móc określić wielkość rozdzielanych białek na każdy żel nakładano marker (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad). Po rozdziale, białka przenoszono na membranę nitrocelulozową (wielkość porów 0,45 µm, Amersham BioSciences, Wielka Brytania) z zastosowaniem transferu mokrego (1,5-2,5 h; czas zależny od wielkości badanego białka, 50 V) również z pomocą aparatu firmy Bio-Rad (Bio-Rad, USA) w odpowiednim buforze (Tabela II).

9.5.1.2. Immunochemiczna detekcja białek

Po zakończonym transferze, białka uwięzione w membranie barwiono za pomocą roztworu Ponceau S (Tabela II). Po odpłukaniu Ponceau S z pomocą buforu TBS-T (ang. Tris Buffered Saline with Tween) (Tabela II), blokowano membrany w roztworze odtłuszczonego mleka w TBS-T (M-TBS-T, 5%) lub w 5% roztworze surowiczej albuminy bydlęcej (ang. bovine serum albumin, BSA) przez 1 h/R.T., w celu uniknięcia niespecyficznego wiązania przeciwciał. Zablockowane membrany inkubowano przez noc w roztworze przeciwciała I-rzędowego w M-TBS-T, w 4°C. Wszystkie przeciwciała i szczegółowe warunki dla konkretnych badanych białek umieszczono w Tabeli III. Po zakończonej inkubacji membrany trzykrotnie płukano (TBS-T, 3x5 min, R.T.) a następnie inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym skoniugowanym z peroksydazą chrzanową (ang. horseradish peroxidase, HRP) w M-TBS-T, 1 h/R.T.. Po zakończeniu inkubacji membrany ponownie płukano (TBS-T, 3x5 min, R.T.), po czym poddawano reakcji chemiluminescencyjnej za pomocą odczynnika ECL, zawierającego substrat dla HRP

(Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, USA lub ECL Select Westren Blotting Dectection Reagent, Amersham BioSciences, Wielka Brytania). Detekcji sygnału dokonywano za pomocą aparatu FUSION FX (Vilber Lourmat, Niemcy), a analizę densytometryczną prowadzono z wykorzystaniem oprogramowania TotalLab v1.11 (TotalLab, Wielka Brytania). Po zakończonej procedurze membrany płukano, a następnie, w celu ponownego wykorzystania membran do oznaczeń, poddawano procesowi odmywania (ang. stripping), czyli usunięcia związanych z membraną przeciwciał, z wykorzystaniem odpowiedniego buforu (Tabela II), przez 30 min w R.T. Po odmyciu przeciwciał membrany ponownie płukano w TBS-T (3x5 min, R.T.).

Tabela II. Skład wykorzystywanych buforów

Bufor	Skład
Bufor do elektroforezy	25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0,1% SDS, pH 8,3
Bufor do transferu	Bufor C (100 mM NaHCO ₃ , 30 mM Na ₂ CO ₃), 20% MetOH, pH 8,3
Ponceau S	0,1% Ponceau S, 5% CH ₃ COOH
TBS-T	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,6
M-TBST	Roztwór 5% odtłuszczonego mleka w TBST
Bufor do odmywania przeciwciał	1% SDS, 50 mM glicyna-HCl, pH 2,0
Żel zagęszczający	H ₂ O, 4 % akrylamid; 0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% TEMED; 0,05% nadsiarazan amonu
Żel rozdzielający	H ₂ O, 10 % akrylamid; 0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,05 % TEMED; 0,05% nadsiarazan amonu H ₂ O, 15% akrylamid, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS; 0,05 % TEMED; 0,05% nadsiarazan amonu

Tabela III. Warunki reakcyjne dla badanych białek

Białko	Gęstość żelu	Warunki blokowania	Przeciwciało I-rzędowe	Przeciwciało II-rzędowe
Iba1	15%	5% M-TBST 1 h/R.T.	Kozie przeciwciało anty-Iba1 5% M-TBST 1:1000 cała noc/4°C ab5076, Abcam, Wielka Brytania	Przeciwciało anty-kozie sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:4000 1 h/R.T. Sc-2056, Santa Cruz Biotechnology, USA
Nitrotyrozyna	10%	5% BSA-TBST 1 h/R.T.	Mysie przeciwciało anty-Nitrotyrosyne 1% BSA 1:400 cała noc/4°C Sc-32757, Santa Cruz Biotechnology, USA	Przeciwciało anty-mysie sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:4000 1h/R.T. A28177, Invitrogen, USA
NRF2	10%	5% M-TBST 1 h/R.T.	Mysie przeciwciało anty-NRF2 5% M-TBST 1:400 cała noc/4°C 66504-I-Ig Proteintech, USA	Przeciwciało anty-mysie sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:4000 1 h/R.T. A28177, Invitrogen, USA
Mfn1	10%	5% M-TBST 1 h/R.T.	Królicze przeciwciało anty-Mitofusin-1 5% M-TBST 1:500 cała noc/4°C ABC41, Merck, Niemcy	Przeciwciało anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:4000 1 h/R.T. A0545, Sigma-Aldrich, USA
Mfn2	10%	5% M-TBST 1 h/R.T.	Królicze przeciwciało anty-Mitofusin-2 5% M-TBST 1:500 cała noc/4°C M6319, Sigma-Aldrich, USA	Przeciwciało anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:4000 1 h/R.T. A0545, Sigma-Aldrich, USA
Opa1	10%	5% M-TBST 1 h/R.T.	Królicze przeciwciało anty-Opa1 5% M-TBST 1:1000 cała noc/4°C D6U6N, Cell Signaling Technology, USA	Przeciwciało anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:4000 1 h/R.T. A0545, Sigma-Aldrich, USA
pDpr1	10%	5% BSA-TBST 1 h/R.T.	Królicze przeciwciało anty-pDPR1 (Ser616) 5% BSA w TBST 1:1000 cała noc/4°C PA5-64821, Invitrogen, USA	Przeciwciało anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:4000 1 h/R.T. A0545, Sigma-Aldrich, USA
Drp1	10%	5% M-TBST 1 h/R.T.	Królicze przeciwciało anty-Drp1	Przeciwciało anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową

			5% M-TBST 1:300 cała noc/4°C ABT155, Merck, Niemcy	5% M-TBST 1:4000 1h/R.T. A0545, Sigma-Aldrich, USA
Fis1	15%	5% M-TBST 1 h/R.T.	Królicze przeciwciało anty-Fis1 5% M-TBST 1:500 cała noc/4°C SAB2702049 Sigma Aldrich, USA	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:4000 1 h/R.T. A0545, Sigma-Aldrich, USA
GDAP1	10%	5% M-TBST 1 h/R.T.	Królicze przeciwciało anty-GDAP1 5% M-TBST 1:300 cała noc/4°C HPA014266, Sigma- Aldrich, USA	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:4000 1 h/R.T. A0545, Sigma-Aldrich, USA
LC3	15%	5% M-TBST 1 h/R.T.	Królicze przeciwciało anty-LC3 5% M-TBST 1:250 cała noc/4°C L8918, Sigma-Aldrich, USA	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:4000 1 h/R.T. A0545, Sigma-Aldrich, USA
PINK1	10%	5% M-TBST 1 h/R.T.	Mysie przeciwciało anty-PINK1 5% M-TBST 1:500 cała noc/4°C Sc-517353, Santa Cruz Biotechnology, USA	Przeciwciało anti-mysie sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:4000 1 h/R.T. A28177, Invitrogen, USA
Parkina	10%	5% M-TBST 1h/R.T.	Mysie przeciwciało anty-Parkin 5% M-TBST 1:500 cała noc/4°C Sc-32282, Santa Cruz Biotechnology, USA	Przeciwciało anti-mysie sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:4000 1 h/R.T. A28177, Invitrogen, USA
VDAC1	10%	5% M-TBST 1h/R.T.	Królicze przeciwciało anty-VDAC1 5% M-TBST 1:500 cała noc/4°C AB10527, Merck, Niemcy	Przeciwciało anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:4000 1 h/R.T. A0545, Sigma-Aldrich, USA
GAPDH	10% lub 15%	5% M-TBST 1h/R.T.	Królicze przeciwciało anty-GAPDH sprzężone z peroksydazą chrzanową 5% M-TBST 1:8000 1 h/R.T. HRP-60004 Proteintech, USA	---

9.5.2. Immunochemiczna analiza poziomu cytokin w surowicy krwi metodą Luminex

Pomiar poziomu cytokin wykonano we współpracy z Zakładem Farmakologii Doświadczalnej IMDiK PAN. Krew pobierano po uśpieniu zwierzęcia, następnie odstawiano w celu wytworzenia się skrzepu i wirowano (1000 x g/5 min). Surowicę przenoszono do nowych probówek i badano za pomocą technologii Luminex xMAP z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Bio-Plex Pro™ Rat Cytokine 23-Plex Assay (Bio-Rad, USA), zgodnie z wytycznymi producenta. W skrócie: rozcieńczone na płytce 96-dółkowej próbki inkubowano z mikrokulkami opłaszczonymi odpowiednimi przeciwciałami. Następnie inkubowano z mieszaniną przeciwciał swoistych dla badanych antygenów, a w ostatnim kroku – ze streptawidyną sprzężoną z fikoerytryną (SA-PE). Pomędzy poszczególnymi etapami reakcji, próbki płukano trzykrotnie za pomocą buforu do płukania, wchodzącego w skład wykorzystywanego do badania zestawu reakcyjnego. Intensywność sygnału pochodzącego z fikoerytryny jest proporcjonalna do stężenia w próbkach badanych antygenów. Pomiaru dokonywano z pomocą urządzenia Luminex Bio-Plex 200 (Bio-Rad, USA). Uzyskane wyniki normalizowano do zawartości białka w próbce.

9.6. Metody spektrofluorymetryczne

9.6.1. Analiza mitochondrialnego potencjału błonowego

Pomiar mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$) opierał się na pomiarze fluorescencji barwnika - jodku 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazokarbocyaniny (JC-1, Sigma-Aldrich, USA). JC-1 jest barwnikiem zdolnym do agregacji, którego monomery emitują zieloną fluorescencję (527 nm). Wysoki potencjał błonowy promuje formowanie agregatów, emitujących fluorescencję czerwoną (590 nm). Obniżenie potencjału powoduje translokację barwnika i jego rozpad do monomerów, co łączy się ze zmianą fluorescencji. Stosunek fluorescencji zielonej do czerwonej odzwierciedla poziom $\Delta\Psi_m$. Pomiaru prowadzono na izolowanych mitochondriach, zgodnie z wytycznymi producenta, w dwóch powtórzeniach. Na płytkę nakładano odpowiednio rozcieńczone mitochondria (po 40 μ g białka), a następnie dopełniano mieszaniną reakcyjną zawierającą JC-1. Płytkę inkubowano 7 min/R.T. w ciemności, a następnie rozpoczynano pomiar. Fluorescencję mierzono z użyciem

spektrofluorymetru TECAN Infinite M1000PRO przy długości fali pobudzenia $\lambda = 490$ nm i emisji $\lambda = 590$ nm. Uzyskane wyniki normalizowano do zawartości białka w próbce.

9.6.2. Pomiar poziomu wolnych rodników tlenowych przy użyciu sondy H₂DCF-DA

W zastosowanej metodzie pomiaru RFT wykorzystywano niepolarną sondę diocetan 2',7'-dichlorodihydrofluorescyny (H₂DCF-DA), która po wnikięciu do wnętrza komórki ulega deacetylacji przez esterazy błonowe do 2',7'-dichlorodihydrofluorescyny (H₂DCF). W obecności RFT DCFH zostaje utleniona do 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF) o właściwościach fluorescencyjnych [Koss-Mikołajczyk *et al.*, 2017].

Z tkanki przygotowywano 1% homogenat w buforze PBS (pH 7,4), który następnie inkubowano z 10 μ M H₂DCF-DA (37°C/45 min/w ciemności) na płytce 96-dołkowej. Fluorescencję DCF mierzono w dwóch powtórzeniach, z użyciem spektrofluorymetru TECAN Infinite M1000PRO, przy długości fali pobudzenia $\lambda = 488$ nm i emisji $\lambda = 525$ nm. By upewnić się, że deacetylacja próby nie będzie miała wpływu na uzyskane wyniki, jako kontrolę pozytywną wykorzystano dwa dodatkowe powtórzenia inkubowane z 10 μ M FeCl₂.

9.6.3. Pomiar anionorodnika ponadtlenkowego przy użyciu dihydroetydyny

Detekcję wytwarzania O₂^{•-} prowadzono metodą fluorymetryczną, na podstawie utleniania dihydroetydyny (ang. dihydroethidium, DHE). Utlenianie DHE przez O₂^{•-} prowadzi do wytworzenia 2-hydroksyetydyny o właściwościach fluorescencyjnych [Wojtala *et al.*, 2014]. Z tkanki przygotowywano 10% homogenat w buforze PBS (pH 7,4), który następnie rozcieńczano do stężenia 1% z pomocą buforu PBS zawierającego glukozę (5 mM) oraz DHE (20 μ M), ogrzanego do temperatury 37°C. Pomiar przeprowadzano natychmiast z użyciem spektrofluorymetru TECAN Infinite M1000PRO, przy długości fali pobudzenia $\lambda = 400$ nm i emisji $\lambda = 590$ nm. Uzyskane wyniki normalizowano do zawartości białka w próbce.

9.7. Metody luminescencyjne

9.7.1. Pomiar poziomu mitochondrialnego ATP

Poziom ATP mierzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu (ATP Determination Kit, Thermo Fisher Scientific, USA), zgodnie z zaleceniami producenta. Działanie użytego zestawu opiera się na metodzie luminescencyjnej, wykorzystującej zdolność lucyferazy do produkcji światła jedynie w obecności ATP. Do pomiaru wykorzystano izolowane

mitochondria. Na płytkę 96-dołkową nakładano mieszaninę reakcyjną (dH₂O, firmowy bufor reakcyjny (Component E), DTT, D-lucyferyna oraz rekombinowana lucyferaza), a następnie dodawano odpowiednio rozcieńczone standardy (w celu uzyskania krzywej wzorcowej) oraz próbki, w dwóch powtórzeniach. Pomiaru dokonywano z użyciem aparatu TECAN Infinite M1000PRO (560 nm).

9.8. Metody mikroskopowe

9.8.1. Analiza immunohistochemiczna z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej

Badania immunohistochemiczne wykonano we współpracy ze Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych IMDiK PAN. W celu przygotowania tkanki mózgu na potrzeby barwień immunohistochemicznych przeprowadzono eutanazję szczurów metodą perfuzji. Zwierzęta poddano znieczuleniu ogólnemu, poprzez dootrzewnowe podanie mieszaniny ketaminy i ksylazyny (odpowiednio 100 i 10 mg/kg masy ciała, dootrzewnowo). Po zniesieniu czucia głębokiego, szczury unieruchamiano, uwidaczniano serce i wkłuwano się w jego lewą komorę jednocześnie przecinając prawy przedsionek serca. Za pomocą pompy perystaltycznej oraz przy użyciu 0.9% NaCl przygotowanego w 0.1M buforze PBS (pH 7,4) wypłukiwano krew, a następnie tkanki utrwalano 4% roztworem paraformaldehydu. Mózgi umieszczano w zimnym roztworze utrwalającym (3 h w 4°C), a następnie w 20% roztworze sacharozy w 0.1 M PBS (cała noc w 4°C). Następnie mózgi mrożono na suchym lodzie i przechowywano w -80°C. Zmrożone tkanki umieszczano w kriostacie (45 min/-27°C) i krojono na skrawki grubości 40 µm. W celu przygotowania tkanki do barwień immunohistochemicznych skrawki płukano trzykrotnie buforem PBS, a następnie inkubowano w 1% roztworze H₂O₂ w PBS przez 30 min (blokowanie endogennej peroksydazy). Skrawki ponownie płukano, po czym blokowano przez 1h w R.T. w roztworze 5% surowicy ośle (ang. Normal Donkey Serum, NDS) w 0.1 M PBS + 0.3% TritonX100. Po blokowaniu skrawki inkubowano przez 60 min w R.T. lub całą noc w 4°C z przeciwciałem pierwszorzędowym w 5% NDS, 1% BSA, 0,3% TritonX100 i 0.1 M PBS. Następnie skrawki płukano i inkubowano z wyznakowanym fluorescencyjnie przeciwciałem drugorzędowym w 5% NDS, 1% BSA, 0,3% TritonX100, i 0,1 M PBS, przez 60min w R.T. w ciemności. Po ponownym płukaniu, skrawki nakładano na szkiełka podstawowe, suszono i pokrywano ProLong Gold Antifade Mountant zawierającym barwnik fluorescencyjny DAPI (ang. 4'6-diamidino-2-phenylindole)

wiążący się do DNA. Tak przygotowane próby analizowano przy użyciu laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 780/ELYRA PS.1. (Carl Zeiss Meditec) oraz oprogramowania ZEN 2012. Zdjęcia optymalizowano pod kątem koloru, jasności i kontrastu dla uzyskania najwyraźniejszego obrazu

9.8.2. Analiza ultrastruktury mitochondriów z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Badania z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) wykonano w Pracowni Badań Mikroskopowo–Elektronowych IMDiK PAN. Szczury poddano znieczuleniu ogólnemu z użyciem mieszaniny ketaminy i ksylazyny (odpowiednio 100 i 10 mg/kg masy ciała, dootrzewnowo), a następnie poddano perfuzji przez lewą komorę serca - początkowo przy użyciu 0.9% NaCl w 0,01M buforze fosforanowym, a następnie z 2% paraformaldehydem i 2,5% aldehydem glutarowym w 0,1M buforze kakodylowym (Sigma-Aldrich), pH 7,4, w 20°C. Tkanki po perfuzji przechowywano w zimnym roztworze utrwalającym przez 20h, a następnie umieszczano w mieszaninie 1% OsO₄ i 0,8% K₄[Fe(CN)₆]. Próby odwadniano przeprowadzając przez szereg alkoholi oraz tlenek propylenu (C₃H₆O), a następnie utrwalało w żywicy epoksydowej (Epon 812). Ultra-cienkie skrawki (60nm) analizowano przy użyciu TEM firmy JEM-1011EX (JEOL Co.), z użyciem kamery MORADA i oprogramowania iTEM 1233.

9.9. Testy behawioralne

9.9.1. Test otwartego pola

Test otwartego pola (ang. open field test) pozwala na analizę zarówno poziomu lęku badanego zwierzęcia wobec czynnika stresującego (nieznana, otwarta przestrzeń), jak również aktywność lokomotoryczną i poziom eksploracji nowego środowiska. Test wykonywano około 40 dnia życia zwierząt. Szczura umieszczano w rogu boksie o wymiarach 55 × 55 × 50 cm, wykonanego z szarych płyt PCV. Jako strefę centralną wyznaczono kwadrat o wymiarach 36.5 cm × 36.5 cm. Pomiaru dokonywano przez 5 minut, zachowanie zwierzęcia rejestrowano z pomocą kamery Basler acA1300-60 GigE (Basler AG, Niemcy), a analizowano z pomocą oprogramowania Ethovision XT 10 (Noldus Information Technology, Holandia). Analizie poddawano całkowity dystans pokonany przez zwierzę, średnią prędkość zwierzęcia, dystans pokonany w strefie centralnej i w strefie peryferyjnej.

9.9.2. Trójkomorowy test socjalizacji

Trójkomorowy test socjalizacji (3-Chamber Social Interaction Test; Crawley's Sociability and Preference for Social Novelty Test) pozwala na analizę interakcji społecznych badanego zwierzęcia ze znanymi lub obcymi osobnikami swojego gatunku. Standardowo, szczur preferuje spędzanie czasu z drugim osobnikiem („towarzystwo”, ang. sociability) niż samotnie, jak również wykazuje większe zainteresowanie nowym osobnikiem niż osobnikiem wcześniej poznanym („nowość społeczna” ang. *social novelty*). Test przeprowadzano około 50-51 dnia życia. Badane zwierzę umieszczano w podłużnym boksie (45 × 85 × 40 cm z szarej płyty PCV), podzielonym na trzy komory (komory peryferyjne: 29 x 40 cm, komora środkowa: 20 x 40 cm) (Rycina 8). Komory połączone były przejściami o szerokości 10cm, pozwalającymi zwierzęciu na swobodny dostęp do wszystkich obszarów boksu. W rogach dwóch skrajnych komór boksu ustawione zostały metalowe klatki (17,5 x 12 x 12 cm). Test składał się z trzech faz trwających po 10min. W fazie I (faza habituacji) badane zwierzę umieszczano w środkowej komorze i zostawiano do swobodnej eksploracji. Po 10 minutach zwierzę delikatnie kierowano do środkowej komory i wyjścia blokowano. Jedną z metalowych klatek (stronę zmieniano co test, by uniknąć wpływu preferencji strony przez zwierzęta) zamieniano na identyczną klatkę ze szczurem w środku (tzw. wizytator), nieznanym zwierzęciu badanemu. Wejścia odblokowywano i rozpoczynała się faza II (faza preferencji socjalnych). Po upływie 10min badanego szczura ponownie kierowano do środkowej komory i zamykano. Następnie pustą metalową klatkę zamieniano na identyczną z kolejnym wizytatorem w środku, również nieznanym zwierzęciu badanemu. Po odblokowaniu wejść rozpoczynała się faza III (faza preferencji nowości). Po upływie 10 minut wszystkie zwierzęta wracały do klatek. W trakcie trwania testu wszystkie ruchy badanego zwierzęcia rejestrowano z pomocą kamery Basler acA1300-60 GigE (Basler AG, Niemcy), a następnie analizowano przy użyciu programu BehaView 0.0.21 (<http://www.pmbogusz.net, Polska>).



Rycina 8. Boks wykorzystywany do trójkomorowego testu socjalizacji. W środku umieszczono metalowe klatki na wizytatorów. W środkowej komorze widoczne zamknięte przejścia.

9.9.3. Test izolacji od matki

Test izolacji od matki przeprowadzono we współpracy z mgr. Rafałem Polowym z Pracowni Behawioralno-Metabolicznej IMDiK PAN. U szczurzych osesków zachowania komunikacyjne można oceniać poprzez badanie wokalizacji ultradźwiękowych (ang. ultrasonic vocalizations, USV). Test izolacji od matki wykorzystuje naturalną tendencję szczurzych osesków do emitowania USV pod wpływem odizolowania od matki i rodzeństwa. Test przeprowadzano kolejno w 9, 10 i 11 dniu życia młodych. Oseski (zarówno samce jak i samice) zabierano z rodzimej klatki i umieszczano w pudełku wymoszczonym ściółką z rodzimej klatki i umieszczonym na podkładzie grzewczym, ustawionym na 35°C. Następnie oseski umieszczano pojedynczo w szklanym pojemniku, który ustawiano w styropianowym pudełku o wymiarach 24 × 27,5 × 21 cm, z umocowanym wewnątrz mikrofonem ultradźwiękowym CM16/CMPA (Avisoft Bioacoustics, Niemcy). Mikrofon podłączony był do urządzenia UltraSoundGate 116Hb (Avisoft Bioacoustics, Niemcy). Sesja nagraniowa trwała 5 minut. Po zakończeniu nagrania oseski dołączano do reszty miotu. Nagrane USV analizowano z wykorzystaniem cyfrowej analizy spektrograficznej w programie SASLab Pro (Avisoft Bioacoustics, Niemcy).

9.9.4. Test preferencji ściółki

Test preferencji ściółki przeprowadzono we współpracy z dr Pawłem Boguszewskim z Pracowni Metod Behawioralnych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN. Test ten bada zachowania młodych zwierząt związane z poszukiwaniem gniazda na podstawie rozpoznawania zapachu ze środowiska rodzinnego. W 15 dniu życia, młode były pojedynczo izolowane i umieszczane w nowej klatce, w połowie wypełnionej ściółką z klatki rodzimej (o znajomym zapachu). Drugą połowę klatki wypełniono nową ściółką. Zachowanie zwierząt było nagrywane, a sesja nagraniowa trwała 5 minut. Czas spędzony w każdej z części klatki był zliczany automatycznie.

9.10. Analiza statystyczna otrzymanych wyników

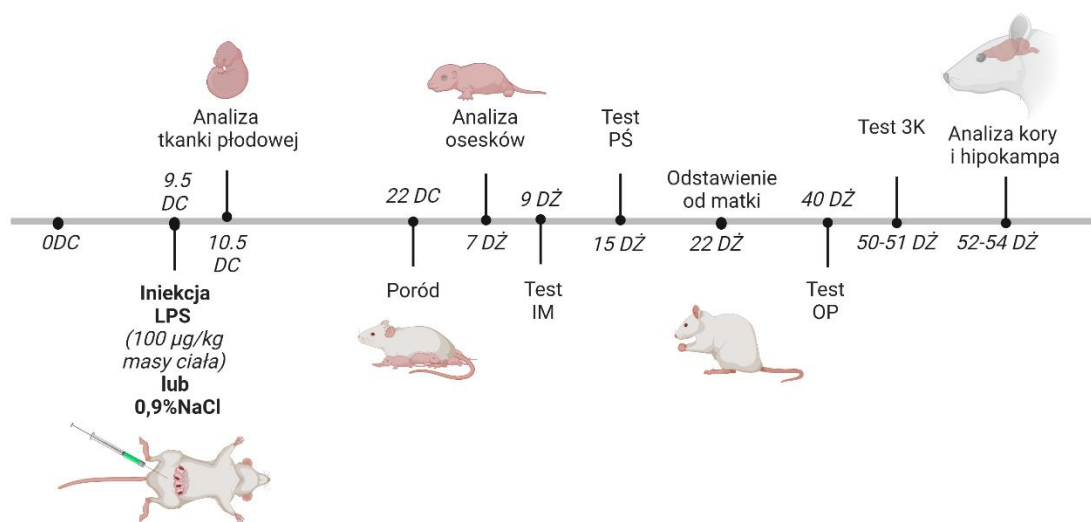
Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem programu Graph Pad Prism (Graph Pad Software, USA). Otrzymane w trakcie eksperymentów wyniki wyrażano jako wartość średnią \pm błąd standardowy średniej (SEM) obliczone z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). Normalność rozkładu badano z użyciem testu Shapiro-Wilka. Istotność statystyczną różnic między grupami badano z wykorzystaniem testu *t*-Studenta. W przypadku zmiennych poza rozkładem normalnym stosowano test Manna-Whitneya. W przypadku testu izolacji od matki sprawdzono wariancje serii z wykorzystaniem testu jednorodności wariancji Levene'a. Wyniki uznawano za istotne statystycznie, gdy $p < 0,05$. Poziom istotności statystycznej przedstawiono jako: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

10. Wyniki

10.1. Aktywacja układu odpornościowego matki oraz jej wpływ na ekspresję cytokin prozapalnych w tkance płodowej oraz w łożysku

10.1.1. Model matczynej aktywacji układu odpornościowego

W badaniach wykorzystano szczurzy model matczynej aktywacji układu odpornościowego (MIA), który uzyskiwano poprzez jednorazową dootrzewnową iniekcję LPS ciężarnej samicy szczurów stada Wistar w 9,5 dniu ciąży (otrzymany z *E. coli* serotyp 055:B5, 100 µg/kg m.c., grupa LPS). Natomiast szczury kontrolne otrzymały sterylną sól fizjologiczną (0,9% NaCl, grupa kontrolna) (Rycina 9).

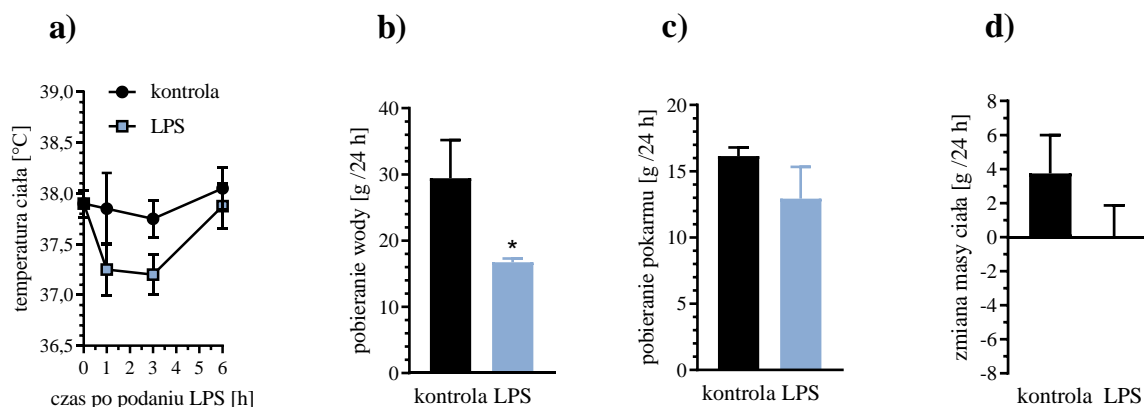


Rycina 9. Schemat przebiegu eksperymentu. W 9,5 dniu ciąży samicom szczurów stada Wistar podawano dootrzewnowo LPS (100 µg/kg m.c.), zwierzęta kontrolne otrzymały sól fizjologiczną (0,9% NaCl). Matki obserwowano pod kątem pogorszenia stanu fizycznego przez 24 godziny od iniekcji. Po 24 godzinach od iniekcji, w 10,5 dniu ciąży, część matek poddawano eutanazji, a płody pobierano do dalszych analiz. Poród następował w ciągu 22 dni od zapłodnienia, po 7 dniach od porodu mioty wyrównywano, część osesków poddawano eutanazji, a mózgi wykorzystywano do dalszych badań. W 9-11 dniu życia przeprowadzano test izolacji od matki, w 15 dniu życia test preferencji ściółki. W 22 dniu życia młode odstawiano od matek, w 40 dniu życia poddawano je testowi otwartego pola, a w 50-51 dniu życia przeprowadzano test trójkomorowy socjalizacji. W 52-54 dniu życia młode poddawano eutanazji. Dalsze eksperymenty prowadzono na korze mózgu i hipokampie samców potomnych. DC - dzień ciąży; DŻ - dzień życia; IM - test izolacji od matki; PŚ - test preferencji ściółki; OP - test otwartego pola; 3K - trójkomorowy test socjalizacji.

LPS jest powszechnie stosowany do wywoływania ogólnoustrojowej reakcji zapalnej i był wcześniej z powodzeniem wykorzystywany w Zakładzie Komórkowej Transdukcji Sygnału

(ZKTS) w celu indukcji reakcji zapalnej i pobudzenia układu odpornościowego w modelach chorób neurodegeneracyjnych [Czapski *et al.*, 2013; Dominiak *et al.*, 2017]. Iniekcja LPS skutecznie naśladuje efekt infekcji bakteryjnej bez konieczności stosowania patogenu. Badania ostatnich lat wskazują, że infekcje bakteryjne w trakcie ciąży, szczególnie te diagnozowane w trakcie pobytu w szpitalu, zwiększają ryzyko wystąpienia autyzmu u potomstwa [Zerbo *et al.*, 2015].

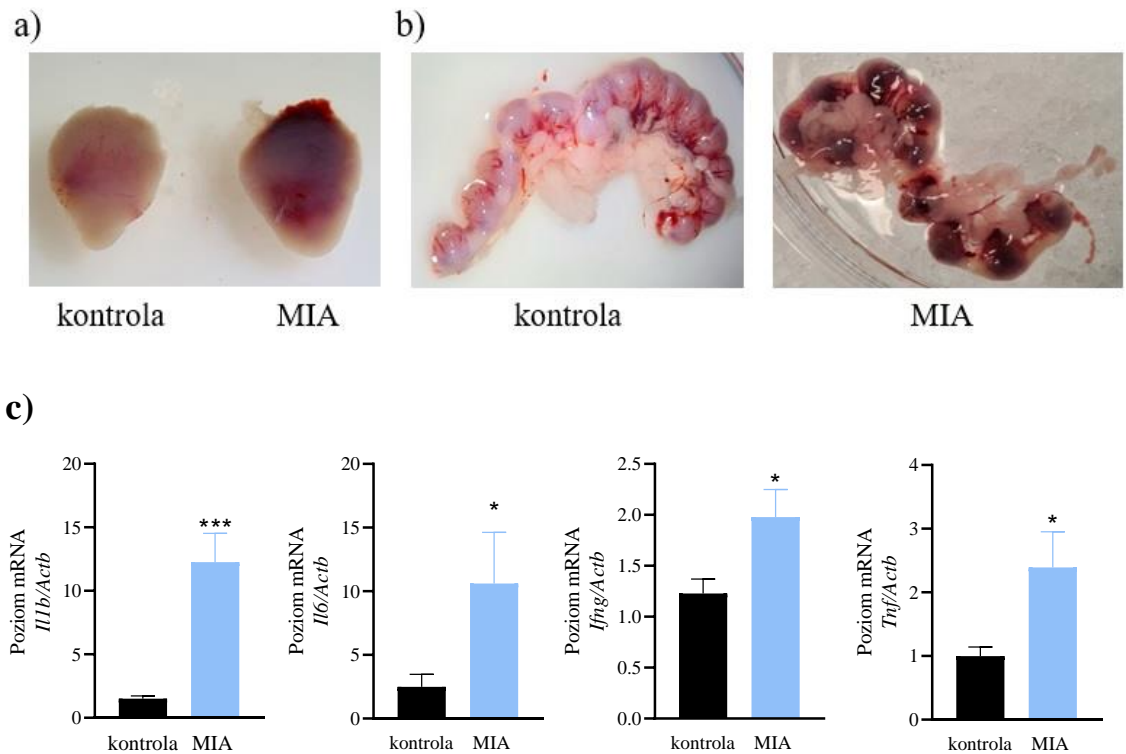
Wyniki badań uzyskane w niniejszej pracy wykazały, iż podanie ciężarnym samicom LPS powodowało przejściowy rozwój objawów ogólnoustrojowego stanu zapalnego, z którym wiązały się zmniejszona ruchliwość, półprzymknięcie oczu oraz zmniejszona reakcja na bodźce (ang. „sickness behaviour”). Nie zaobserwowano natomiast zmian temperatury ciała, za wyjątkiem niewielkiego jej spadku w pierwszej i trzeciej godzinie od podania LPS (Rycina 10a), co może sugerować krótkotrwałe wystąpienie anapireksji w pierwszych trzech godzinach od podania endotoksyny. Jest to zjawisko dość powszechnie obserwowane w odpowiedzi na iniekcję LPS [Caputa *et al.*, 2004; Steiner, 2009]. W ciągu 24 godzin po zastrzyku, u ciężarnych samic z grupy LPS zaobserwowano zmniejszenie pobierania wody (Rycina 10b) oraz tendencję spadkową w pobieraniu pokarmu w stosunku do grupy kontrolnej (Rycina 10c), co jest typową zmianą zachowania wywołaną chorobą, nie odnotowano natomiast statystycznie znamiennej różnicy w zmianie masy ciała w grupie LPS w porównaniu do kontroli (Rycina 10d).



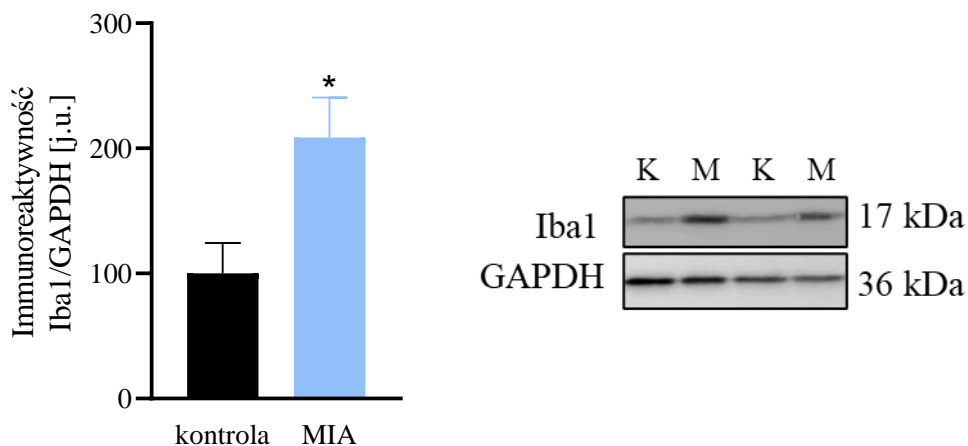
Rycina 10. Analiza stanu ciężarnych matek po podaniu LPS. Po podaniu LPS dokonywano pomiarów temperatury, pobierania wody, pobierania pokarmu oraz masy ciała z pomocą klatek metabolicznych; **a)** Zmiany w temperaturze ciała w ciągu 6 h po zastrzyku (n = 4); **b)** Pobieranie wody w ciągu 24 h po zastrzyku (n = 4); **c)** Pobieranie pokarmu w ciągu 24 h po zastrzyku (n = 4); **d)** Zmiana masy ciała w ciągu 24 h po zastrzyku (n = 4); * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta

10.1.2. Wpływ MIA na ekspresję cytokin prozapalnych w tkance płodowej oraz łożysku

W 24 godzinie po zastrzyku, czyli w 10,5 dniu ciąży część samic poddawano eutanazji i pobierano płody do dalszych analiz. Płody pobrane od matek po iniekcji LPS zaliczono do grupy MIA, a płody od matek kontrolnych do grupy kontrolnej. Zaobserwowano znacznie większe ukrwienie płodów z grupy MIA w porównaniu do tych z grupy kontrolnej (Rycina 11a i b). Analiza qRT-PCR wykazała wzrost ekspresji genów dla kluczowych cytokin prozapalnych, *Il1b*, *Il6*, *Ifng* oraz *Tnf*, odpowiednio o 700%, 330%, 61% i 139% (Rycina 11c). Zwiększona ekspresja cytokin prozapalnych wiąże się z aktywacją komórek układu odpornościowego, w tym makrofagów, a w przypadku mózgu - komórek mikrogleju. Dlatego zbadano poziom białka Iba1, będącego markerem makrofagów oraz mikrogleju [Amici *et al.*, 2017]. Analiza Western blot wykazała wzrost poziomu Iba1 w płodach z grupy MIA o 108% w stosunku do kontroli (Rycina 12).

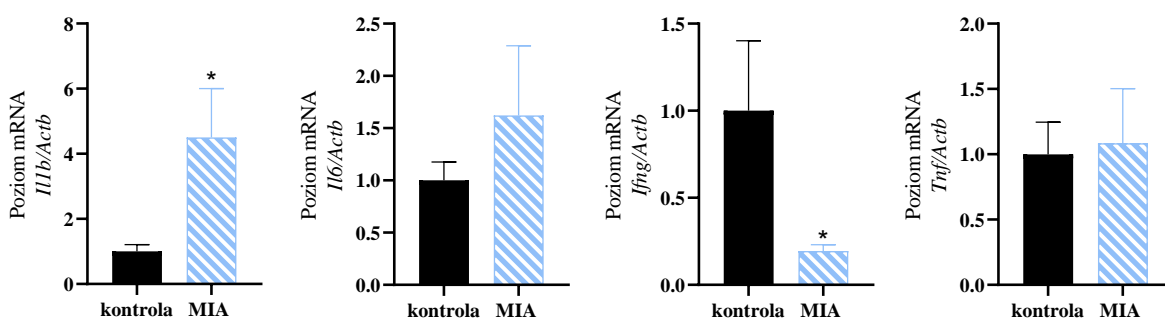


Rycina 11. Zdjęcie płodów wyizolowanych 24 h po iniekcji LPS oraz zmiany w ekspresji genów dla cytokin prozapalnych w tkance płodowej. a) Płody w 10,5 dniu ciąży, 24 h po iniekcji LPS; **b)** Wyizolowane macice z wypełniającymi je płodami, 10,5 dnia ciąży, 24 h po iniekcji LPS, widoczne wyraźne przekrwienie płodów z grupy MIA; **c)** Poziom ekspresji genów *Il1b*, *Il6*, *Ifng* oraz *Tnf* w tkance płodowej, normalizowany względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 8 eksperymentów, (n = 8); * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.



Rycina 12. Poziom białka Iba1 w tkance płodowej 24 h po podaniu LPS. Stosunek immunoreaktywności białka Iba1 do GAPDH w tkance płodowej. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 6 eksperymentów, (n = 6); *p<0,05 w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta. Zdjęcie reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

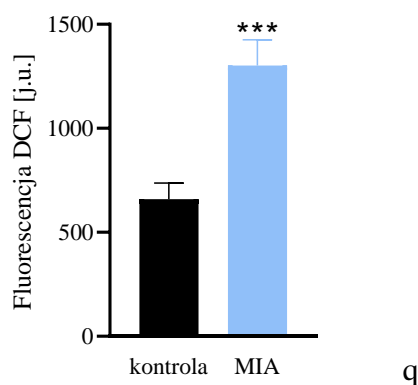
Zmiany ekspresji kluczowych cytokin, które są zaangażowane w stymulowanie i podtrzymywanie odpowiedzi zapalnej zaobserwowano również w łożyskach. Wykazano, iż w łożyskach z grupy MIA wzrasta ekspresja *Il1b* o 350%, podczas gdy ekspresja *Ifng* obniża się o 80% w stosunku do kontroli, natomiast *Il6* i *Tnf* pozostawały bez zmian (Rycina 13).



Rycina 13. Analiza poziomu ekspresji cytokin prozapalnych w łożyskach 24 h po podaniu LPS. Poziom ekspresji genów *Il1b*, *Il6*, *Ifng* oraz *Tnf* w łożyskach. Wyniki normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 6 - 8 eksperymentów, (n = 6 - 8); *p<0,05 w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

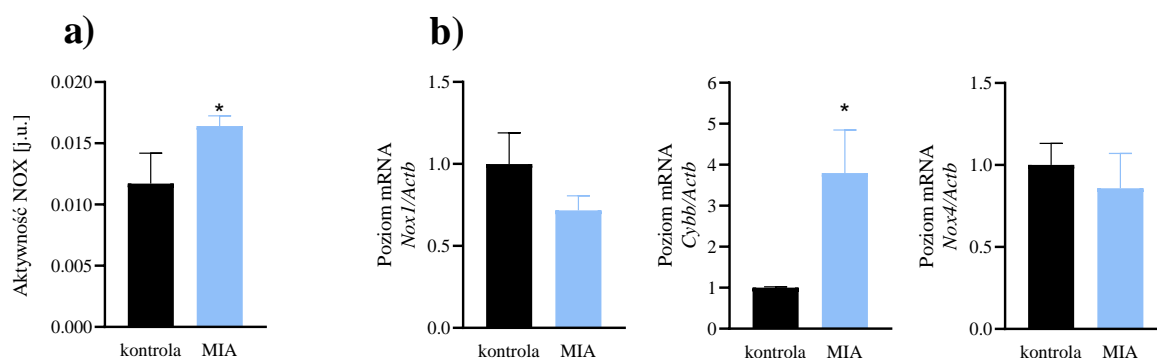
10.1.3. Wpływ MIA na stres oksydacyjny oraz funkcje mitochondriów w tkance płodowej.

Aktywacja układu odpornościowego oraz stan zapalny są ściśle związane ze stresem oksydacyjnym. Zaburzenie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej wiąże się zwykle z nadmierną produkcją RFT (Jopkiewicz 2018). Analiza poziomu RFT przeprowadzona z wykorzystaniem pomiaru utleniania sondy $H_2DCF-DA$ wykazała wzrost fluorescencji sondy o 97% w tkance płodowej w grupie MIA w stosunku do kontroli, co wskazuje na zwiększoną generację RFT (Rycina 14).



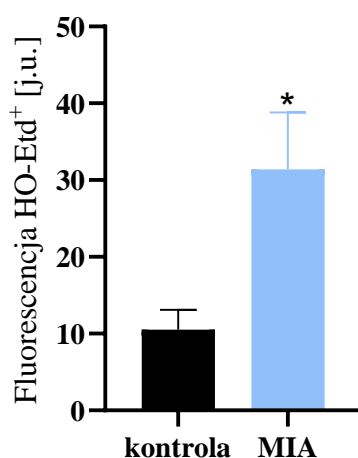
Rycina 14. Generacja reaktywnych form tlenu w tkance płodowej w 24 h po podaniu LPS. Uwalnianie reaktywnych form tlenu w tkance płodowej mierzono z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej $H_2DCF-DA$. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 8 eksperymentów, ($n = 8$); * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli; test t -Studenta.

Jak zaznaczono we Wstępie, jednym z głównych miejsc powstawania wolnych rodników w komórce jest mitochondrium, a dokładnie mitochondrialny łańcuch oddechowy. Jednak znacząca ilość reaktywnych form tlenu powstaje również poza mitochondriami, między innymi w wyniku reakcji katalizowanych przez oksydazy NADPH, białka z rodziny NOX związane z błoną komórkową [Snezhkina *et al.*, 2019], katalizujące powstawanie $O_2^{\cdot-}$ bądź H_2O_2 . W analizowanej tkance płodowej w grupie MIA wykazano wzrost aktywności NOX o 28% w stosunku do kontroli (Rycina 15a). Jednocześnie zaobserwowano 280% wzrost ekspresji genu *Cybb* dla izoformy NOX2, która zlokalizowana jest głównie w komórkach układu odpornościowego (makrofagach i neutrofilach), podczas gdy ekspresja genów *Nox1* i *Nox4* pozostawała bez zmian (Rycina 15b).



Rycina 15. Wzrost aktywności oksydazy NADPH w tkance płodowej w 24 h po podaniu LPS. a) Aktywność oksydazy NADPH badano metodą spektrofotometryczną. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5-7 eksperymentów, (n = 5-7); b) Poziom ekspresji genów *Nox1*, *Cybb* i *Nox4* analizowano metodą qRT-PCR, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5-6 eksperymentów, (n = 5-6); *p<0,05 w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

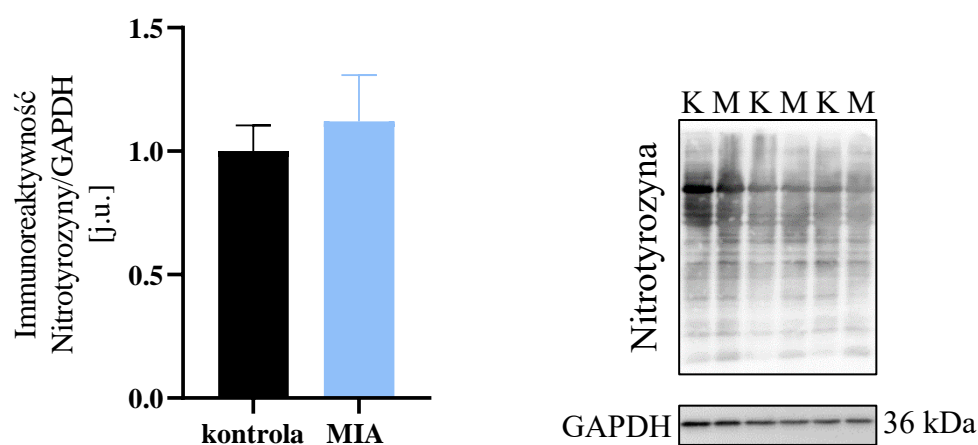
Zwiększoną generację $O_2^{\cdot-}$ w tkance płodowej z grupy MIA potwierdzono z wykorzystaniem metody fluorymetrycznej, na podstawie utleniania dihydroetydyny (DHE) przez $O_2^{\cdot-}$ do 2-hydroksyetydyny (HE). Wykazano wzrost fluorescencji HE o 198% w tkance płodowej MIA w stosunku do kontroli (Rycina 16).



Rycina 16. Generacja $O_2^{\cdot-}$ w tkance płodowej w 24 h po podaniu LPS. Wytwarzanie $O_2^{\cdot-}$ mierzono fluorymetryczną, z wykorzystaniem dihydroetydyny. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 4 eksperymentów (n = 4); *p<0,05 w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

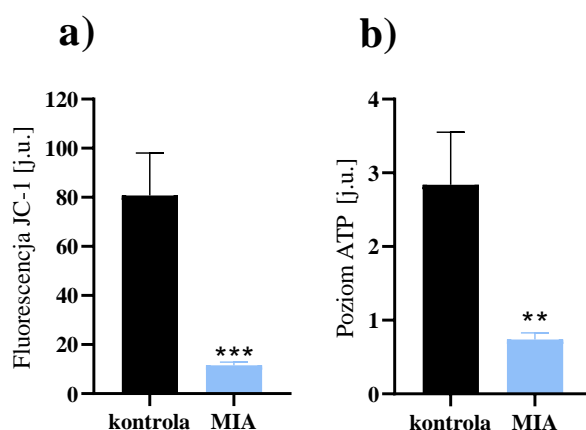
Anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) łatwo reaguje z tlenkiem azotu (NO) tworząc nadtlenoazotyn ($ONOO^-$), powodujący uszkodzenia DNA oraz lipidów i białek. Na skutek przyłączenia grupy $-NO_2$ do pierścienia aromatycznego tyrozyny (z wytworzeniem 3-nitrotyrozyny) dochodzi do modyfikacji polipeptydów [Bandoowala & Sengupta,

2020]. 3-Nitrotyrozyna uważana jest za marker stresu oksydacyjnego, wynikającego z aktywności reaktywnych form azotu (RFA). Dlatego, za pomocą metody Western blot z zastosowaniem specyficznego przeciwciała skierowanego przeciwko nitrotyrozynie zbadano proces nitracji białek. Badania nie wykazały istotnych zmian immunoreaktywności nitrotyrozyny w tkankach płodów z grupy MIA w stosunku do kontroli (Rycina 17), co sugeruje brak znaczącego udziału ONOO^- w obserwowanym stresie oksydacyjnym.



Rycina 17. Analiza poziomu nitrotyrozyny w tkance płodowej w 24 h po podaniu LPS. Stosunek immunoreaktywności nitrotyrozyny do GAPDH w tkance płodowej. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 7 eksperymentów ($n = 7$). Zdjęcie reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

W warunkach zwiększonej ekspresji cytokin prozapalnych oraz w obecności O_2^- produkowanego przez oksydazę NADPH może dochodzić do zaburzenia mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$), który zapewnia siłę napędową dla syntezy ATP oraz jest miarą prawidłowej funkcjonalności mitochondriów. Analiza $\Delta\Psi_m$ metodą opartą na pomiarze zmian fluorescencji barwnika JC-1 oraz analiza mitochondrialnego poziomu ATP z zastosowaniem metody luminescencyjnej wykazały znaczący spadek zarówno $\Delta\Psi_m$ (Rycina 18a) jak i poziomu ATP (Rycina 18b) w wyizolowanych mitochondriach z tkanki płodowej z grupy MIA, odpowiednio o 86% i 74%.



Rycina 18. Analiza funkcji mitochondriów w tkance płodowej w 24 h po podaniu LPS. a) Mitochondrialny potencjał błonowy, mierzony z zastosowaniem pomiaru fluorescencji sondy JC-1 oraz b) poziom ATP mierzony metoda luminescencyjną. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 8 eksperymentów (n = 8); **p<0,01, ***p<0,001 w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

Podsumowując, uzyskane wyniki badań wykazały, iż aktywacja układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży prowadzi do wzrostu ekspresji kluczowych cytokin prozapalnych w tkance płodów wraz ze wzrostem poziomu markera mikrogleju i makrofagów, Iba-1, co wskazuje na obecność toczącej się reakcji zapalnej. W efekcie dochodzi do wzrostu aktywności oksydazy NADPH i zwiększonej ekspresji genu dla izoformy NOX2. Zwiększona produkcja $O_2^{\cdot-}$ przez NOX może prowadzić do uszkodzenia i zmiany potencjału błony mitochondrialnej, a w konsekwencji do obniżenia poziomu ATP i dysfunkcji mitochondriów.

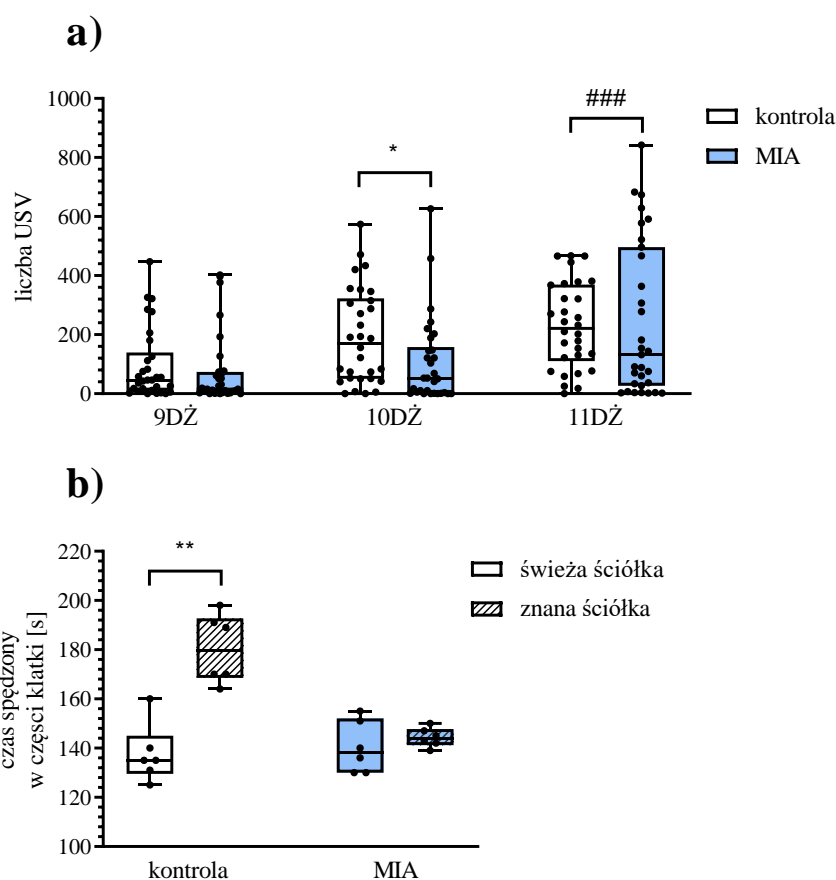
10.2. Wpływ MIA na związane z autyzmem zachowania zwierząt potomnych

Zaburzenia ze spektrum autyzmu charakteryzują się problemami w interakcjach społecznych, komunikacji, oraz ograniczonymi zainteresowaniami i powtarzalnymi zachowaniami [Lord *et al.*, 2018]. Aby zbadać występowanie ASD-podobnych zaburzeń behawioralnych u potomstwa narażonego na prenatalną aktywację układu odpornościowego przeprowadzono odpowiednie testy behawioralne.

10.2.1. Zaburzenia behawioralne u osesków

Typowym modelem do badania komunikacji i interakcji społecznych u szczurów jest test izolacji od matki. W odpowiedzi na izolację od matki, młode komunikują dyskomfort poprzez emisję USV o częstotliwości 40 kHz. Zdolność do wokalizacji jest istotna dla przeżycia młodych, w warunkach naturalnych pozwala na przywołanie matki, mogącej przenieść samotnego oseska do reszty miotu. Badanie ilości wokalizacji pozwala więc na ocenę zdolności komunikacyjnych i interakcji socjalnych osobnika. Liczbę wokalizacji oceniano w 9, 10 i 11 dniu życia. W 10 dniu młode z grupy MIA wokalizowały mniej niż zwierzęta kontrolne, natomiast w 11 dniu życia zaobserwowano wyodrębnienie się dwóch grup osesków MIA, część wokalizowała mniej niż oseski kontrolne, natomiast pozostałe emitowały USV w ilości zbliżonej do kontroli lub większej (Rycina 19a). Uzyskane wyniki wskazują na zaburzenia komunikacji osesków z grupy MIA w odpowiedzi na izolację od matki.

W 15 dniu życia przeprowadzono test preferencji ściółki. Test ten bada zachowania związane z poszukiwaniem gniazda na podstawie rozpoznawania zapachu ze środowiska rodzinnego. Zaobserwowano, iż zwierzęta kontrolne spędzały znacząco więcej czasu w części klatki o znajomym zapachu (Rycina 19b), co jest naturalnym zachowaniem zdrowych zwierząt. Test wykazał, że zwierzęta z grupy MIA spędzały czas w obu częściach klatki w podobnym zakresie, co sugeruje zaburzenie naturalnych instynktów związanych z szukaniem gniazda, należące do zaburzeń społecznych (Rycina 19b).

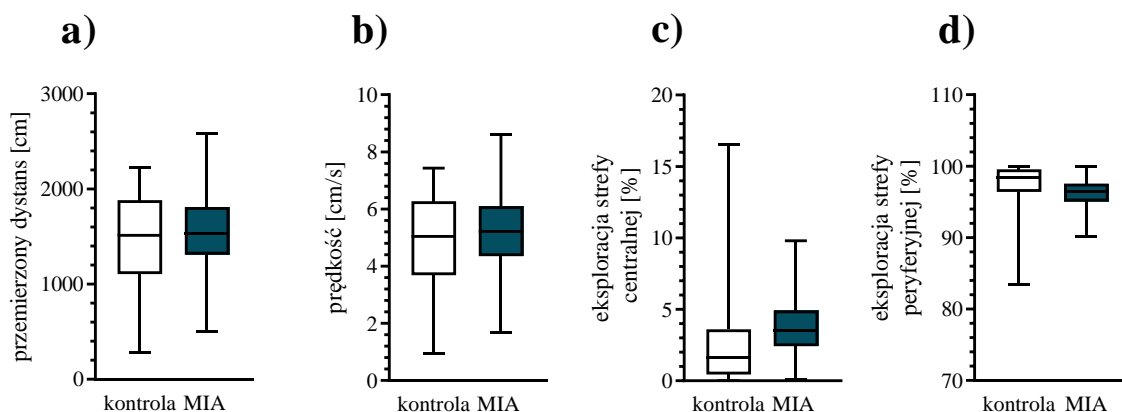


Rycina 19. Analiza zaburzeń komunikacji i społecznych oseków prenatalnie poddanych działaniu MIA. a) Test izolacji od matki. Analizowano powodowane izolacją nawoływanie matki przez osekki. Zliczano ilość wokalizacji ultradźwiękowych, pomiary prowadzono przez trzy kolejne dni (9-11 dni życia). Dane zaprezentowano jako mediany, z rozstępem międzykwartylowym, minimum i maximum, pochodzące z 30-31 eksperymentów ($n = 30$ i 31); $*p < 0.05$ w stosunku do kontroli; test Manna-Whitneya. $###p < 0.001$ w stosunku do kontroli; test Levene'a jednorodności wariancji; **b)** Zaburzenia społeczne badano z użyciem testu preferencji ściółki w 15 dniu życia. Dane zaprezentowano jako mediany, z rozstępem międzykwartylowym, minimum i maximum, pochodzące z 6 eksperymentów ($n = 6$); $**p < 0.01$; test Manna-Whitneya.

10.2.2. Zaburzenia behawioralne u młodego potomstwa

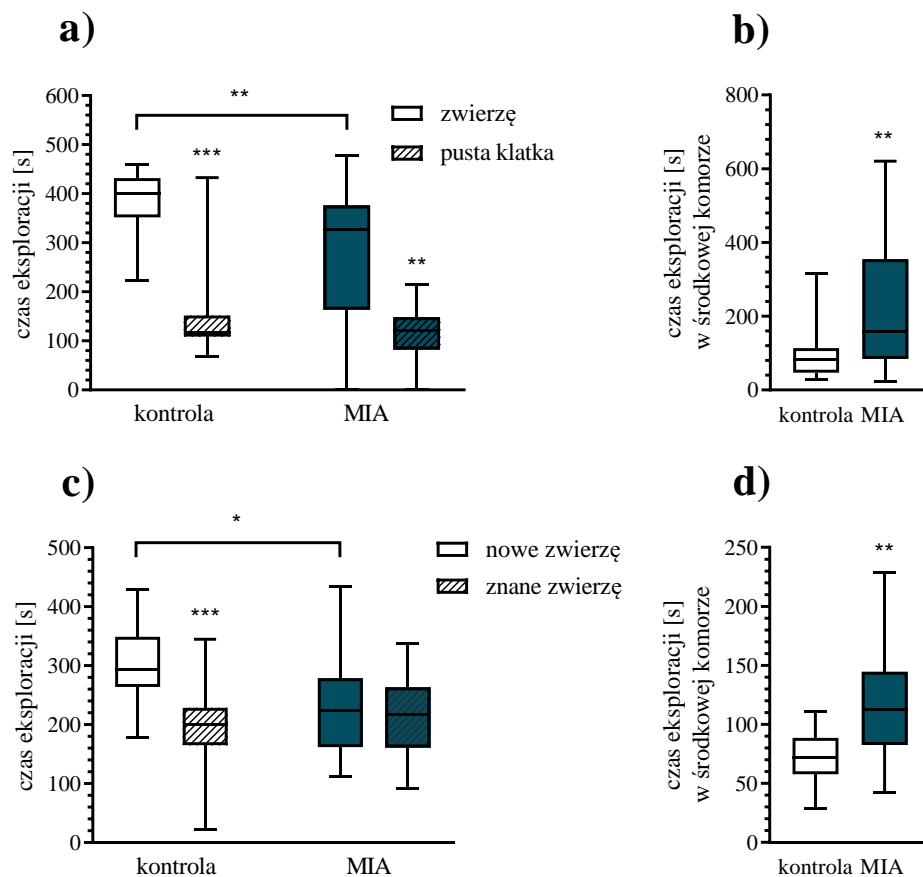
Test otwartego pola dokładnie opisany w rozdziale Materiały i Metody pozwala na ocenę spontanicznej aktywności lokomotorycznej oraz zachowania zwierząt podczas eksploracji nieznanego środowiska, w tym skłonności do unikania otwartych przestrzeni i poruszania się przy ścianach, co jest miarą lęklivosti oraz skłonności do wykazywania stereotypii ruchowej [Hrabovska & Salyha, 2016]. W naszym modelu nie zaobserwowano jednak zmian w tym zakresie. Młode zwierzęta potomne poddane prenatalnej aktywacji

układu odpornościowego nie wykazywały zmniejszonej aktywności czy eksploracji w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej (Rycina 20).



Rycina 20. Ocena aktywności lokomotorycznej oraz zachowań lękowych młodych zwierząt potomnych poddanych prenatalnej aktywacji układu odpornościowego za pomocą testu otwartego pola. Analizowano przemierzony dystans (a) oraz prędkość jego pokonywania (b), jak również eksplorację strefy centralnej (c) i peryferyjnej (d). Dane zaprezentowano jako mediany, z rozstępem międzykwartylowym, minimum i maximum, pochodzące z 28-34 eksperymentów (kontrola n = 28, MIA n = 34).

Zaburzenia w sferze socjalnej obejmujące problemy w interakcjach społecznych są charakterystyczną cechą dla zaburzeń ze spektrum autyzmu. Zdolność zwierząt do interakcji społecznych ze znanymi lub obcymi osobnikami została zbadana z wykorzystaniem testu trójkomorowego, który został dokładnie opisany w rozdziale Materiały i Metody. Test ten pozwala na analizę interakcji społecznych badanego zwierzęcia ze znanymi lub obcymi osobnikami swojego gatunku. Wykazano zaburzenia w zachowaniach społecznych szczurów z grupy MIA. Chociaż zarówno szczury kontrolne jak i szczury MIA preferowały klatkę z wizytatorem w fazie badającej „towarzyskość”, szczury MIA spędzały mniej czasu z drugim szczurem niż zwierzęta kontrolne (Rycina 21a), jednocześnie spędzając więcej czasu w środkowej (pustej) komorze (Rycina 21b). Co więcej, w fazie badającej „nowość społeczną” szczury MIA spędzały podobną ilość czasu z nowym szczurem i zwierzęciem wcześniej poznanym (Rycina 21c), a mając do wyboru dwie komory ze szczurami oraz jedną pustą, ponownie spędzały więcej czasu w pustej komorze w stosunku do kontroli (Rycina 21d).



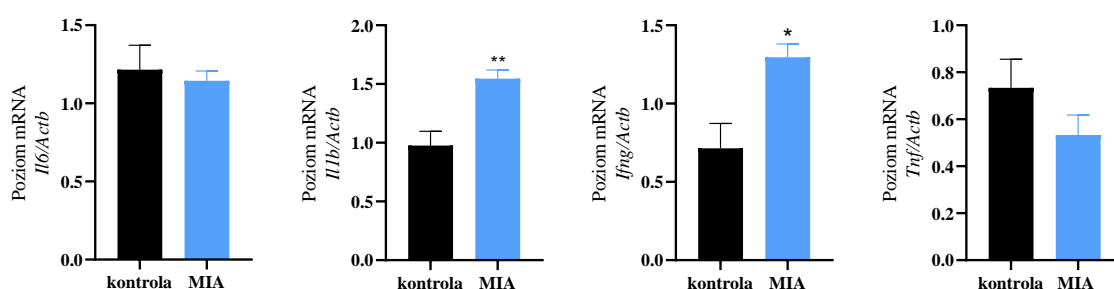
Rycina 21. Analiza zachowań społecznych u młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA mierzona przy użyciu trójkomorowego testu socjalizacji. a) Czas spędzony na eksploracji pustej komory lub komory z nieznanym osobnikiem (faza II); **b)** Czas spędzony w komorze centralnej (faza II); **c)** Czas spędzony na eksploracji komory z nowym lub wcześniej poznanym osobnikiem (faza III); **d)** Czas spędzony w komorze centralnej (faza III). Dane zaprezentowano jako mediany, z rozstępem międzykwartylowym, minimum i maximum, pochodzące z 15-24 eksperymentów (kontrola n = 15, MIA n = 24); *p<0.05, **p< 0.01, ***p<0.001; test Manna-Whitneya.

Podsumowując, przeprowadzone testy behawioralne ujawniły, że aktywacja układu odpornościowego matki powoduje typowe dla autyzmu zaburzenia behawioralne u potomstwa. U osesków z grupy MIA zaobserwowano zaburzenia w komunikacji oraz problemy w interakcjach społecznych. Zaburzenia behawioralne utrzymują się do osiągnięcia dojrzałości, jako iż u młodych zwierząt potomnych z grupy MIA również zidentyfikowano problemy w interakcjach społecznych.

10.3. Wpływ MIA na rozwój procesów prozapalnych oraz stres oksydacyjny w mózgu osesków

10.3.1. Ekspresja wybranych cytokin prozapalnych

Pierwszych 7-10 dni po urodzeniu szczura to okres kluczowy w neurorozwoju i odpowiada okresowi okołoporodowemu u człowieka [Zeiss, 2021]. Dochodzi wówczas do intensywnego rozwoju OUN. Dlatego zmiany ekspresji cytokin oraz stres oksydacyjny w tym okresie jest wyjątkowo niebezpieczny w kontekście rozwijającego się mózgu. Cytokiny są nie tylko mediatorami stanu zapalnego, ale również regulują wzrost, proliferację i aktywność komórek, modulując neuroplastyczność. Wobec powyższego zbadano poziom ekspresji genów dla wybranych cytokin prozapalnych - *Il1b*, *Il6*, *Ifng* oraz *Tnf*. W mózgu 7-dniowych osesków z grupy MIA zaobserwowano wzrost ekspresji *Il1b* i *Ifng* odpowiednio o 58% i 81% w stosunku do kontroli, podczas gdy poziom ekspresji *Il6* oraz *Tnf* nie zmienił się (Rycina 22).

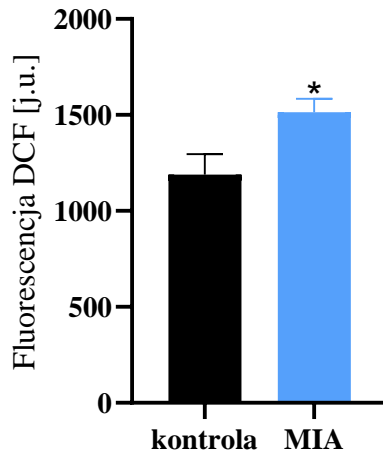


Rycina 22. Analiza poziomu ekspresji cytokin prozapalnych w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA. Poziom ekspresji genów *Il6*, *Il1b*, *Ifng* oraz *Tnf*, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 4-5 eksperymentów (n = 4 - 5); *p<0,05, **p<0,01 w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

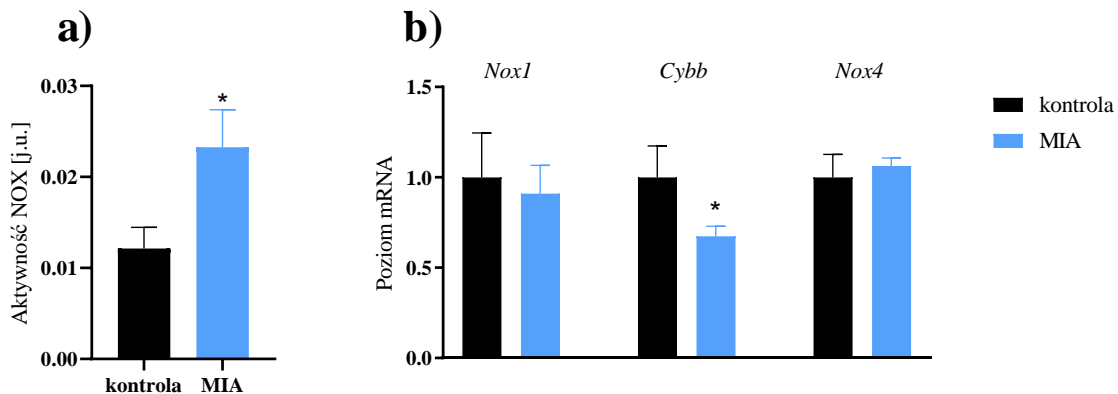
10.3.2. Markery stresu oksydacyjnego

Badania z wykorzystaniem sondy H₂DCF-DA wykazały około 30% wzrost poziomu RFT w mózgu 7-dniowych osesków z grupy MIA w porównaniu do kontroli (Rycina 23). Za wzrost poziomu wolnych rodników może być w znacznym stopniu odpowiedzialna oksydaza NADPH, ponieważ aktywność tego enzymu wzrosła o około 90% w mózgu 7-dniowych osesków z grupy MIA w porównaniu do kontroli (Rycina 24a), chociaż

ekspresja *Nox1* i *Nox4* (Rycina 24b) pozostawały bez zmian, a ekspresja *Cybb* spadała o 34% (Rycina 24b).



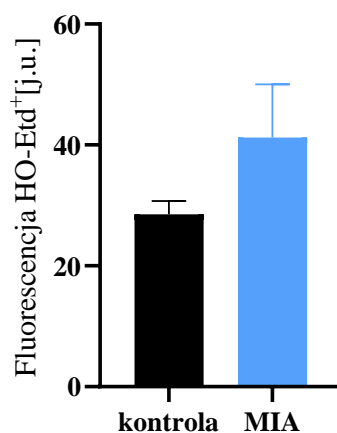
Rycina 23. Generacja reaktywnych form tlenu w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA. Uwalnianie reaktywnych form tlenu mierzono z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej H₂DCF-DA; Prezentowane dane to średnie ± SEM pochodzące z 8 eksperymentów, (n = 8); *p<0,05 w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.



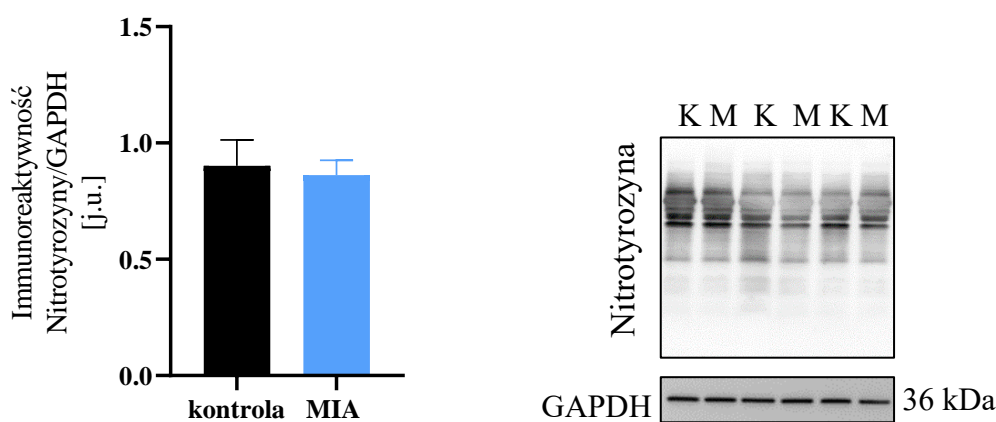
Rycina 24. Wzrost aktywności oksydazy NADPH w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA. a) Aktywność oksydazy NADPH badano metodą spektrofotometryczną. Prezentowane dane to średnie ± SEM pochodzące z 8-7 eksperymentów, (n = 8-7); b) Poziom ekspresji genów *Nox1*, *Cybb* i *Nox4* analizowano metodą qRT-PCR, normalizowano względem genu kodującego β-aktynę (*Actb*); Prezentowane dane to średnie ± SEM pochodzące z 5-6 eksperymentów, (n = 5-6); *p<0,05 w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

Wykazano też wyraźną tendencję wzrostową w kierunku produkcji O₂⁻ (Rycina 25). Aby określić udział reaktywnych form azotu w generacji stresu oksydacyjnego zbadano immunoreaktywność nitrotyrozyny w mózgu 7-dniowych osesków, jednak nie

odnotowano różnic w poziomie 3-nitrotyrozyny w porównaniu do osesków kontrolnych (Rycina 26). Dlatego sugeruje się brak zaangażowania reaktywnych form azotu w aktywację stresu oksydacyjnego w mózgu 7-dniowych osesków.



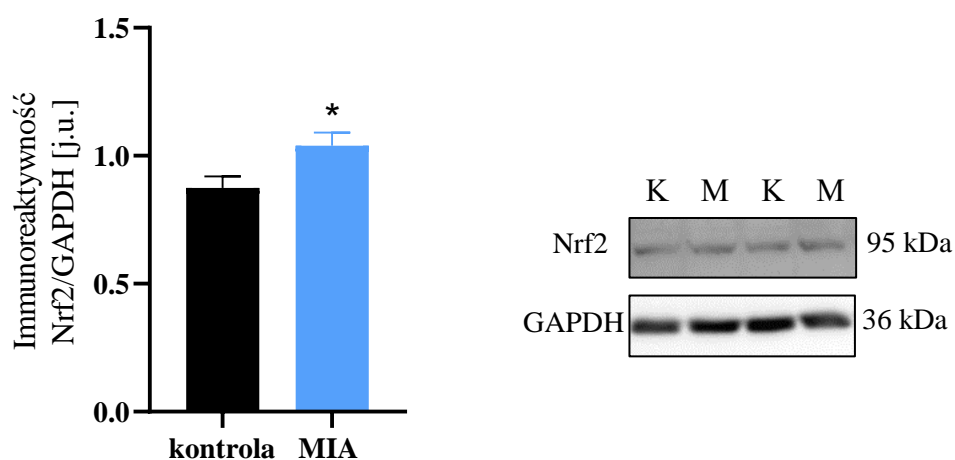
Rycina 25. Generacja O₂^{•-} w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA. Wytwarzanie O₂^{•-} mierzono metodą fluorymetryczną z wykorzystaniem dihydroetydyny. Prezentowane dane to średnie ± SEM pochodzące z 4 eksperymentów (n = 4).



Rycina 26. Analiza poziomu nitrotyrozyny w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA. Stosunek immunoreaktywności nitrotyrozyny do GAPDH. Prezentowane dane to średnie ± SEM pochodzące z 6-7 eksperymentów (n = 6 - 7). Zdjęcie reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

Jak już wcześniej wspomniano, stres oksydacyjny to stan braku równowagi pomiędzy działaniem RFT a biologiczną zdolnością do usuwania wolnych rodników przez systemy antyoksydacyjne. Jednym z kluczowych składników systemu antyoksydacyjnego jest scharakteryzowany we Wstępie czynnik transkrypcyjny Nrf2. W warunkach podwyższonego poziomu RFT reguluje on transkrypcję wielu enzymów związanych z usuwaniem wolnych rodników. W grupie genów podległych Nrf2, znajduje się m.in.

Gpx1, *Txnrd1* (gen dla TrxR), *Sod1* i *Sod2*, czy *Cat*. Dlatego zbadano poziom białka Nrf2 oraz ekspresję podległych mu genów. Wykazano około 20% wzrost poziomu białka Nrf2 w mózгах osesków z grupy MIA (Rycina 27), co sugeruje aktywację mechanizmów obrony antyoksydacyjnej w odpowiedzi na wzrost poziomu RFT. Spośród przeanalizowanych genów dla enzymów obrony antyoksydacyjnej (*Sod1*, *Sod2*, *Cat*, *Gpx1*, *Gpx4* oraz *Txnrd1*) regulowanych przez Nrf2 wykazano wzrost ekspresji *Gpx1* oraz *Cat* o 30% w stosunku do kontroli (Tabela IV).



Rycina 27. Analiza immunoreaktywności białka Nrf2 w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA. Stosunek immunoreaktywności białka Nrf2 do GAPDH. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5 eksperymentów ($n = 5$); * $p < 0,05$, w stosunku do kontroli; test t -Studenta. Zdjęcie reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

Tabela IV. Ekspresja wybranych genów związanych z systemem antyoksydacyjnym w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA. Poziom ekspresji genów *Sod1*, *Sod2*, *Cat*, *Gpx1* i *Gpx4*, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5-6 eksperymentów (n = 5 - 6); *p<0,05 w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

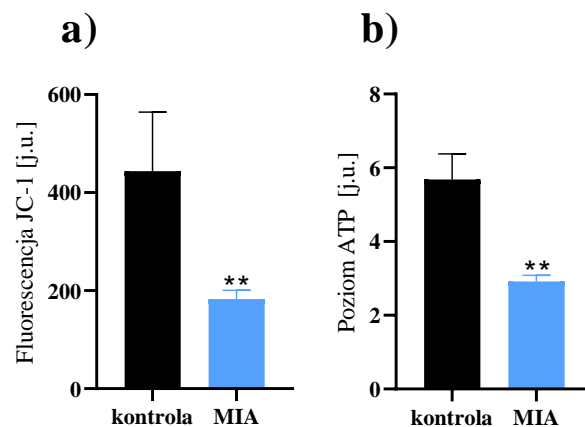
<i>mRNA</i>	kontrola	MIA
<i>Sod1</i>	1,21 \pm 0,05	1,08 \pm 0,08
<i>Sod2</i>	1,33 \pm 0,08	1,25 \pm 0,08
<i>Cat</i>	0,89 \pm 0,04	1,16 \pm 0,10 *
<i>Gpx1</i>	1,00 \pm 0,009	1,13 \pm 0,40 *
<i>Gpx4</i>	1,22 \pm 0,07	1,33 \pm 0,06

Podsumowując, uzyskane wyniki badań wykazały, że aktywacja układu odpornościowego matki na wczesnym etapie ciąży powoduje wzrost ekspresji *Il1b* i *Ifn γ* w mózgu 7-dniowych osesków, co może promować rozwój reakcji zapalnej. Obecność cytokin prozapalnych może prowadzić do aktywacji NADPH oksydazy, a RFT generowane przez ten enzym mogą odgrywać istotną rolę w transdukcji sygnału prowadzącego do aktywacji odpowiedzi zapalnej. Wraz ze wzrostem poziomu wolnych rodników uruchamiane są mechanizmy antyoksydacyjne - zwiększa się poziom czynnika transkrypcyjnego Nrf2, który stanowi jeden z kluczowych elementów odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny oraz wzrasta ekspresja dwóch podległych mu genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, peroksydazę glutationową oraz katalazę.

10.4. Wpływ MIA na stan mitochondriów w mózgu osesków

10.4.1. Funkcjonowanie mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów

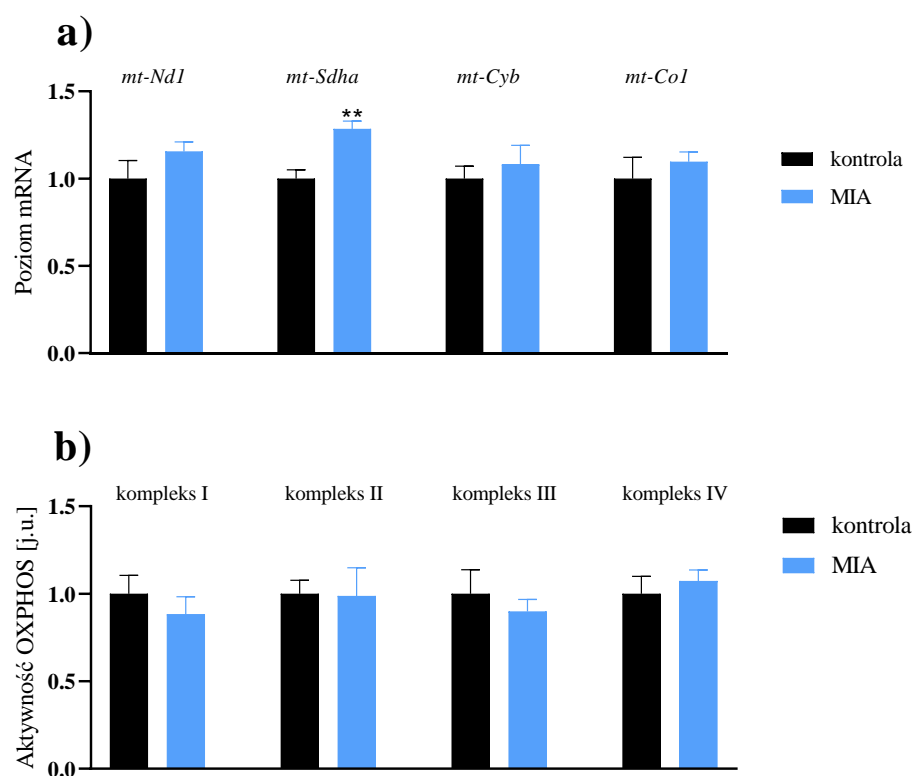
Jak wspomniano wcześniej, mitochondria są wrażliwe na wysoki poziom RFT, a jednocześnie są jednym z głównych źródeł wolnych rodników w komórce. Dlatego, analogicznie jak w przypadku płodów wyizolowanych 24 godziny po indukcji MIA, również u 7-dniowych osesków analizowano $\Delta\Psi_m$ oraz poziom mitochondrialnego ATP. Zaobserwowano spadek $\Delta\Psi_m$ oraz poziomu ATP, odpowiednio o 41% i 51%. (Rycina 28).



Rycina 28. Analiza funkcji mitochondriów w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA.

a) Mitochondrialny potencjał błonowy, mierzony z zastosowaniem pomiaru fluorescencji sondy JC-1 oraz **b)** poziom ATP mierzony z zastosowaniem pomiaru luminescencji. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 7 eksperymentów ($n = 7$); ** $p < 0,01$ w stosunku do kontroli; test t -Studenta.

Zmiany mitochondrialnego potencjału błonowego oraz spadek produkcji ATP mogą być również konsekwencją nieprawidłowości w funkcjonowaniu łańcucha transportu elektronów. Wobec tego zbadano ekspresję genów dla podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego - *mt-Nd1*, *mt-Sdha*, *mt-Cyb* oraz *mt-Co1*, oraz aktywność wszystkich czterech kompleksów (CI, CII, CIII, CIV). Nie zaobserwowano jednak zmian w ekspresji genów dla poszczególnych kompleksów (Rycina 29a) oraz ich aktywności (Rycina 29b), z wyjątkiem kompleksu II, którego ekspresja wzrosła o 28% w porównaniu do zwierząt kontrolnych.



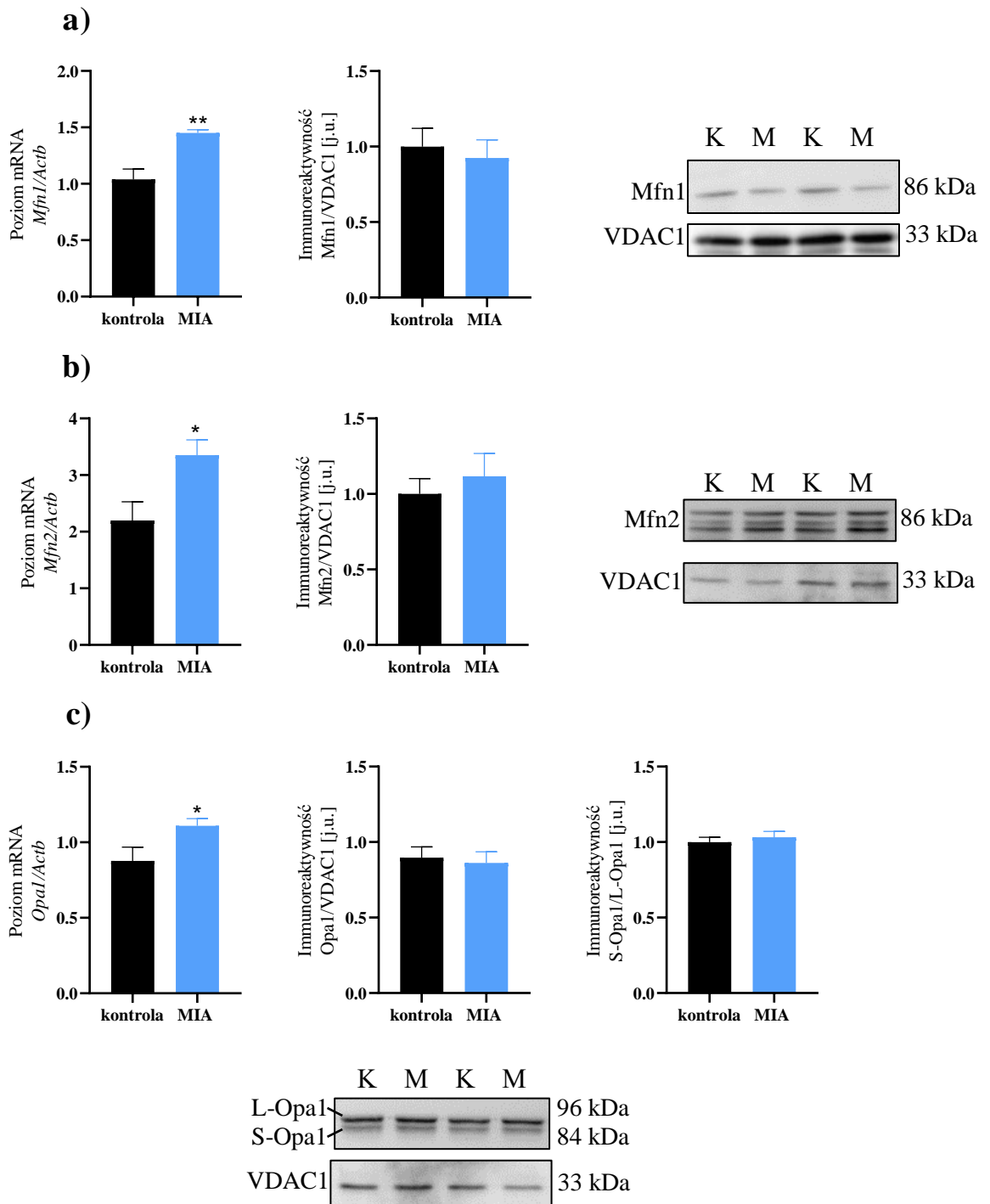
Rycina 29. Analiza funkcji łańcucha oddechowego w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA. a) Poziom ekspresji genów *mt-Nd1*, *mt-Sdha*, *mt-Cyb* oraz *mt-Co1*, normalizowany względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 4-5 eksperymentów ($n = 4 - 5$); ** $p < 0,01$ w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta; **b)** Poziom aktywności czterech kompleksów łańcucha oddechowego (CI, CII, CIII, CIV). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5-9 eksperymentów ($n = 8, n = 9, n = 5, n = 5$).

10.4.2. Dynamika, biogeneza oraz autofagia mitochondriów

10.4.2.1. Fuzja i fragmentacja

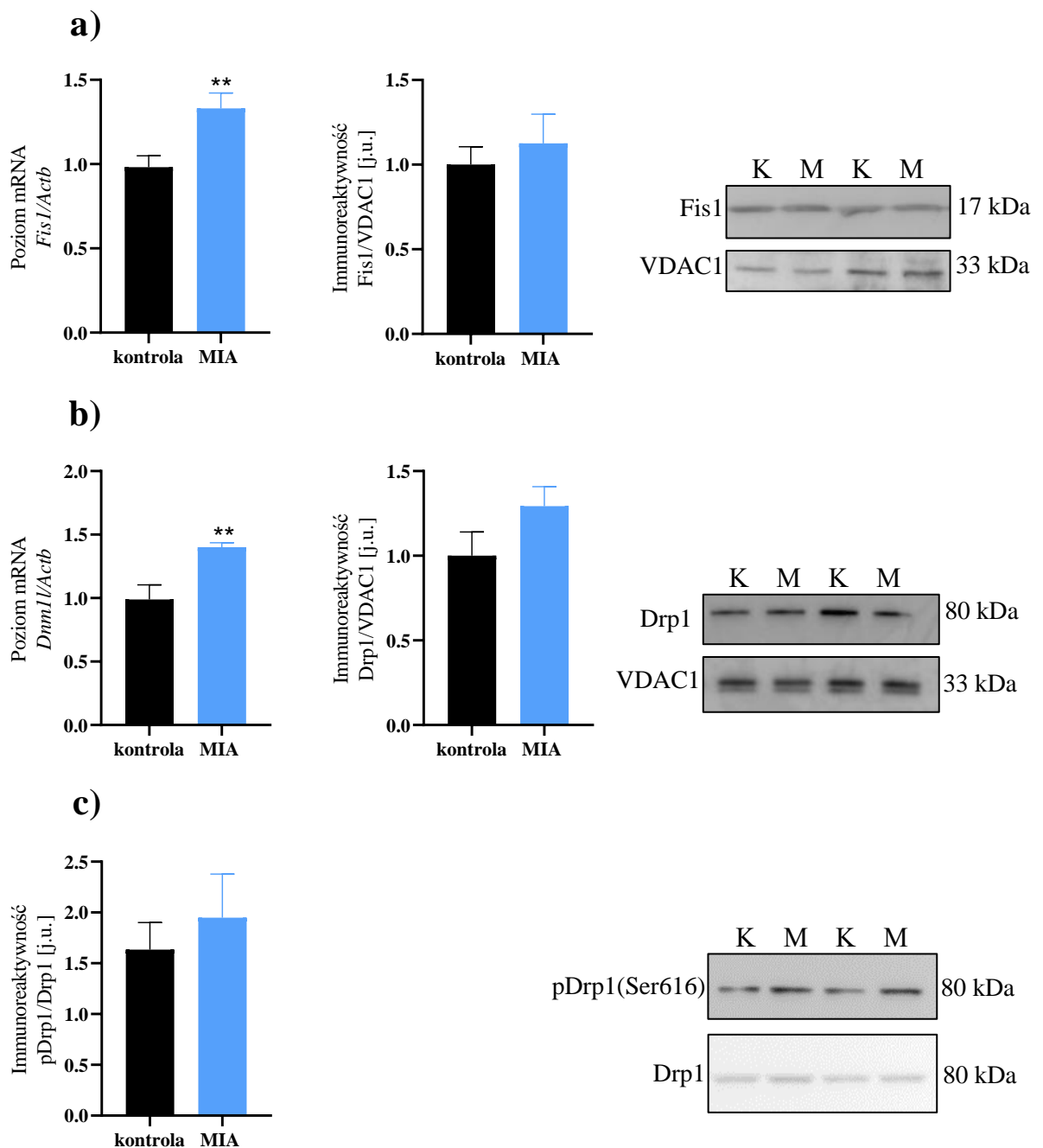
Mitochondria to dynamiczne organella tworzące nieustannie zmieniającą się sieć [Bereiter-Hahn & Jendrach, 2010], w wyniku uzupełniających się procesów fuzji i fragmentacji. Zmiany mitochondrialnego potencjału błonowego wpływają na dynamikę sieci mitochondrialnej. W związku z obniżonym potencjałem błony mitochondrialnej w grupie MIA przeanalizowano ekspresję genów oraz poziom białek regulujących fuzję: *Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1*, a także kluczowych w procesie fragmentacji: *Fis1* oraz *Drp1* (gen *Dnm1l*). Badania wykazały wzrost ekspresji genów dla białek związanych z fuzją, *Mfn1* o 40%, *Mfn2* o 52% i *Opa1* o 27%. Jednak analiza Western blot nie wykazała zmian w immunoreaktywności tych białek (Rycina 30a, b, c). Zbadano także stosunek S-*Opa1*/L-*Opa1*, ponieważ wzrost stosunku S-*Opa1*/L-*Opa1* wiąże się ze zmniejszeniem

intensywności procesu fuzji [Ge *et al.*, 2020]. W niniejszych badaniach nie zaobserwowano jednak znaczących zmian w stosunku S-Opa1/L-Opa1 w mózgu 7-dniowych osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA (Rycina 30c).



Rycina 30. Analiza ekspresji i poziomu białek związanych z fuzją mitochondriów w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA. Poziom ekspresji *Mfn1* (a), *Mfn2* (b) i *Opa1* (c), normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 4-5 eksperymentów ($n = 4 - 5$); Stosunek immunoreaktywności białka *Mfn1* (a), *Mfn2* (b) i *Opa1* (c) do *VDAC1* oraz stosunek *S-Opa1/L-Opa1* (c) w mitochondriach izolowanych z mózgu osesków. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 6-8 eksperymentów ($n = 6 - 8$); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta. Zdjęcia reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

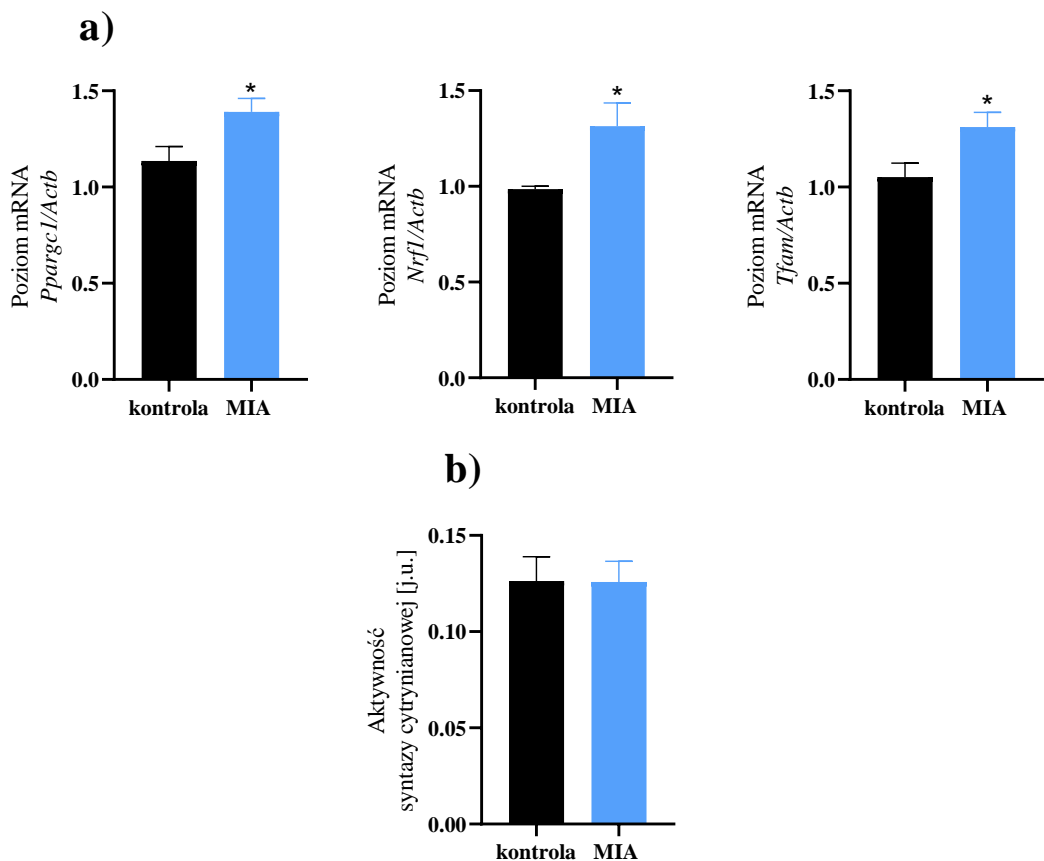
Podobnie jak w przypadku genów kodujących białka fuzji, wzrosła również ekspresja genów związanych z fragmentacją, *Fis1* o 35% i *Dnm1l* o 42% (Rycina 31a i b). Wzrostowi ekspresji nie towarzyszył jednak wzrost immunoreaktywności badanych białek, choć w przypadku obu białek widoczna była tendencja wzrostowa (Rycina 31a i b). Nadekspresja białka Drp1 nie jest czynnikiem wystarczającym do zwiększenia poziomu fragmentacji mitochondriów, a kluczową rolę w aktywności, lokalizacji oraz dynamice tego białka pełnią różnego rodzaju modyfikacje potranslacyjne. Fosforylacja Drp1 na serynie 616 zwiększa jego aktywność i pełni ważną rolę w inicjacji fragmentacji mitochondriów [Ko *et al.*, 2016]. Uzyskane wyniki badań wskazują na niewielki wzrost fosforylacji Drp1 na serynie 616, jednak nie są to zmiany istotne statystycznie (Rycina 31c).



Rycina 31. Analiza ekspresji i poziomu białek związanych z dynamiką mitochondriów w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA. Poziom ekspresji *Fis1* (a) i *Dnm1l* (b) normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5 eksperymentów ($n = 5$); Stosunek immunoreaktywności białka Fis1 (a), Drp1 (b) do VDAC1 w mitochondriach izolowanych z osesków. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 7-8 eksperymentów ($n = 7 - 8$); Stosunek pDrp1(Ser616) do Drp1 (c). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5 eksperymentów ($n = 5$); **<math><0,01</math> w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta. Zdjęcia reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

10.4.2.2. Biogeneza i selektywna autofagia mitochondriów

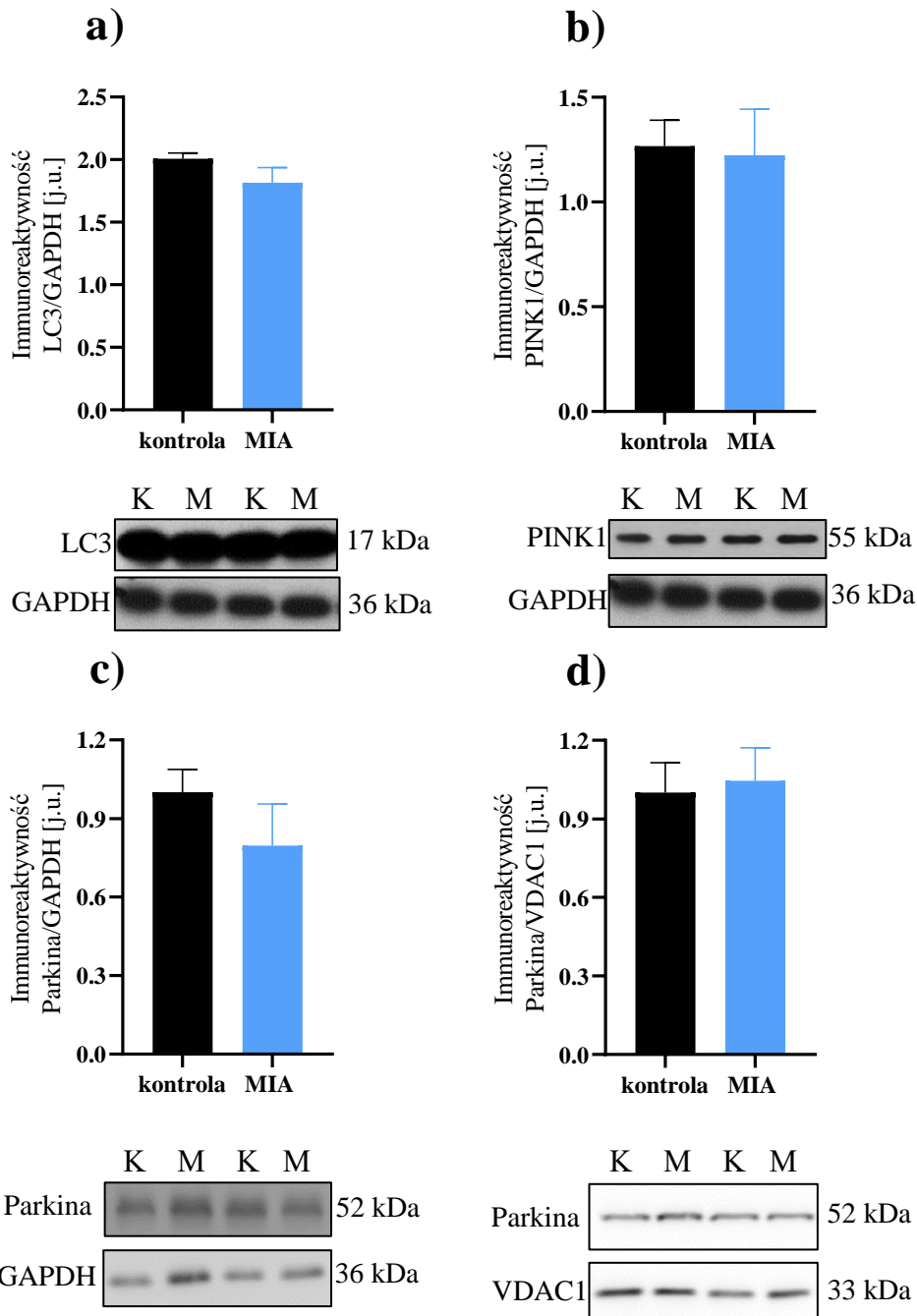
Funkcjonowanie i utrzymywanie sprawnej sieci mitochondrialnej jest ściśle zależne od biogenezy oraz selektywnej autofagii mitochondriów - mitofagii. Wśród najważniejszych białek zaangażowanych w proces biogenezy mitochondriów wymienia się PGC1 α , NRF1 oraz TFAM. W mózgu 7-dniowych osesków z grupy MIA zaobserwowano wzrost ekspresji genów odpowiedzialnych za biogenezę mitochondriów, *Ppargc1* o 23%, *Nrf1* o 33% oraz *Tfam* o 24% (Rycina 32a). Jednak analiza aktywności syntazy cytrynianowej, powszechnie stosowana jako marker zawartości mitochondriów w tkance [Larsen *et al.*, 2012], nie wykazała różnic w aktywności tego enzymu pomiędzy grupą MIA i kontrolną, co sugeruje brak zmian w ilości mitochondriów (Rycina 32b). Wobec powyższego zbadano poziom białek regulujących usuwanie mitochondriów na drodze wyspecjalizowanej autofagii czyli mitofagii.



Rycina 32. Analiza ekspresji białek związanych z biogenezą mitochondriów i aktywności syntazy cytrynianowej w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA. a) Poziom ekspresji genów *Pparg1*, *Nrf1* i *Tfam*, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5-6 eksperymentów ($n = 5 - 6$); b) Poziom aktywności syntazy cytrynianowej. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 8 eksperymentów ($n = 8$); * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli; test t-Studenta.

Mitofagia może przebiegać z wykorzystaniem kilku ścieżek, za pomocą których dochodzi do usuwania wadliwych i nieprawidłowo funkcjonujących mitochondriów, jednak najważniejsza jest ścieżka uwzględniająca udział białka PINK1 i parkiny. Stosując technikę Western blot zbadano poziom białka PINK1 i parkiny oraz podstawowego markera autofagii, białka LC3. Immunoreaktywność badanych białek nie zmieniała się w mózgu 7-dniowych osesków z grupy MIA w porównaniu do kontroli (Rycina 33a, b i c). Ponadto, nie zaobserwowano zmian poziomu parkiny w wyizolowanych mitochondriach z mózgow 7-dniowych osesków z grupy MIA w stosunku do kontroli (Rycina 33d), co sugeruje, iż mimo obniżenia potencjału błony mitochondrialnej nie dochodzi do rekrutacji tego białka do mitochondriów, a mitofagia zależna od PINK1

i parkiny nie jest aktywowana i nie dochodzi do usuwania nieprawidłowo funkcjonujących organelli.



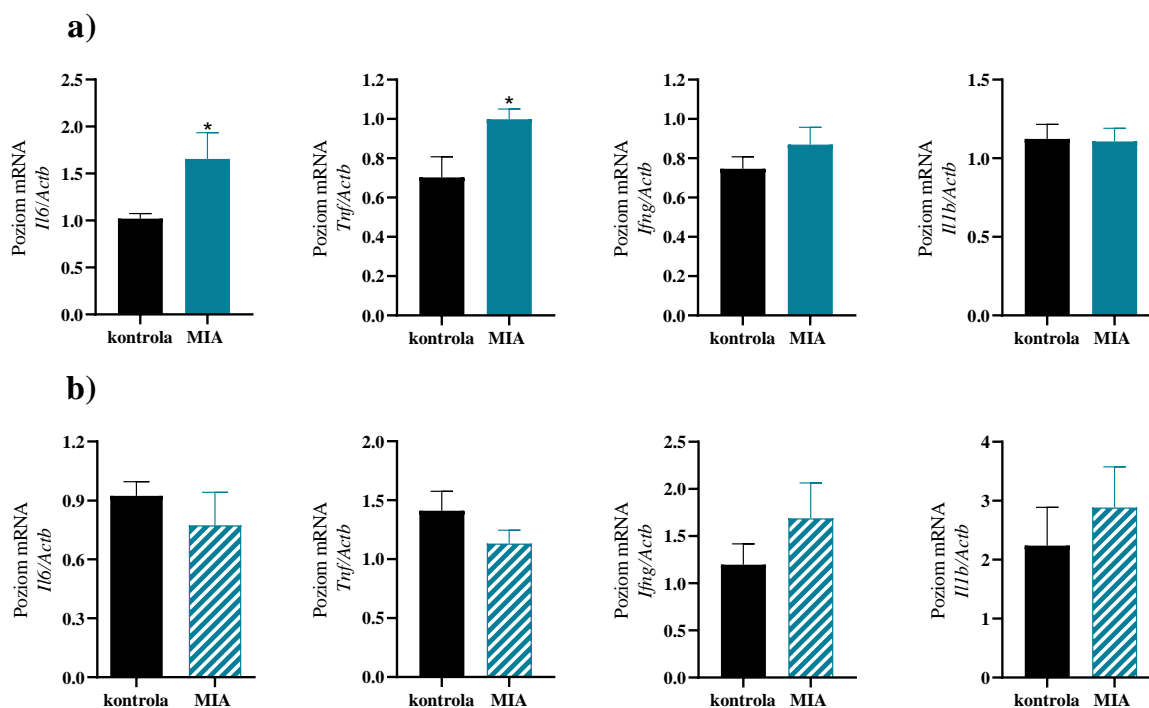
Rycina 33. Analiza poziomu białek związanych z mitofagią w mózgu osesków prenatalnie poddanych działaniu MIA. Stosunek immunoreaktywności LC3 (a), PINK1 (b) i parkiny (c) do GAPDH w mózgu 7-dniowych osesków. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5-7 eksperymentów ($n = 5 - 7$); Stosunek immunoreaktywności parkiny (d) do VDAC1 w izolowanych mitochondriach z mózgu osesków. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5 eksperymentów ($n = 5$). Zdjęcia reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

Podsumowując, wykazano iż w mózgu 7-dniowych osesków poddanych prenatalnej aktywacji układu odpornościowego matki na wczesnym etapie ciąży dochodzi do obniżenia potencjału błony mitochondrialnej oraz spadku produkcji ATP, mimo prawidłowo funkcjonującego łańcucha transportu elektronów. Pomimo zaburzonego potencjału błony mitochondrialnej, nie zaobserwowano aktywacji mitofagii zależnej od PINK1 i parkiny, nie zmieniła się również zawartość mitochondriów w tkance (wyrażona aktywnością syntazy cytrynianowej). Sugeruje to, iż nieefektywnie funkcjonujące mitochondria nie są usuwane, a wśród mitochondriów obecnych w tkance istnieje pula organelli o obniżonym potencjale błonowym.

10.5. Wpływ MIA na aktywację procesów prozapalnych oraz stresu oksydacyjnego w mózgu młodych zwierząt potomnych

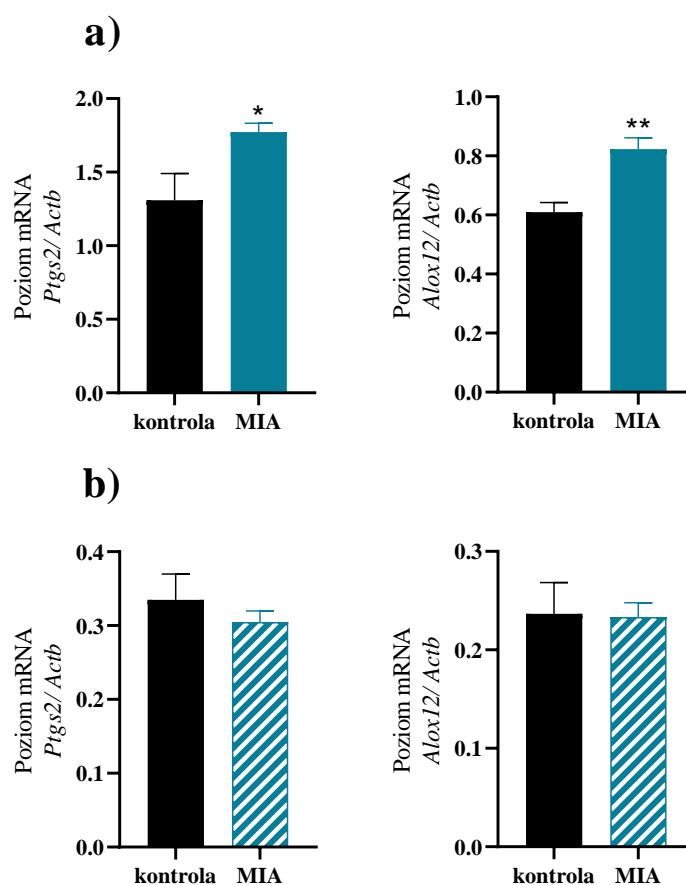
10.5.1. Ekspresja cytokin prozapalnych i aktywacja mikrogleju

Do badań nad długofalowym wpływem MIA na mózg potomstwa wybrano 52-54 dzień życia zwierząt biorących udział w eksperymencie, co odpowiada początkowi szczerzego „okresu dojrzewania”. Okres ten wiąże się z intensywnymi zmianami zarówno w OUN jak i w całym organizmie. By sprawdzić, czy wzrost ekspresji cytokin prozapalnych obserwowany na wcześniejszych etapach rozwoju, w mózgu 7-dniowych osesków z grupy MIA, utrzymuje się w mózgu młodych zwierząt potomnych, zbadano ekspresję genów *Il6*, *Tnf*, *Ifng* oraz *Il1b* w korze mózgu oraz w hipokampie. W korze mózgu zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji *Il6* oraz *Tnf* odpowiednio o 63% i 42% w stosunku do kontroli. Ekspresja *Ifng* oraz *Il1b* nie zmieniała się (Rycina 34a). W hipokampie nie zaobserwowano różnic w poziomie ekspresji cytokin prozapalnych w stosunku do kontroli (Rycina 34b).



Rycina 34. Analiza ekspresji genów związanych ze stanem zapalnym w korze mózgu i hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. a) Poziom ekspresji genów *Il6*, *Tnf*, *Ifng* oraz *Il1b* w korze mózgu, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 4-5 eksperymentów (n = 4 - 5); **b)** Poziom ekspresji genów *Il6*, *Tnf*, *Ifng* oraz *Il1b* w hipokampie, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 4-5 eksperymentów (n = 4 - 5); *p<0,05 w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

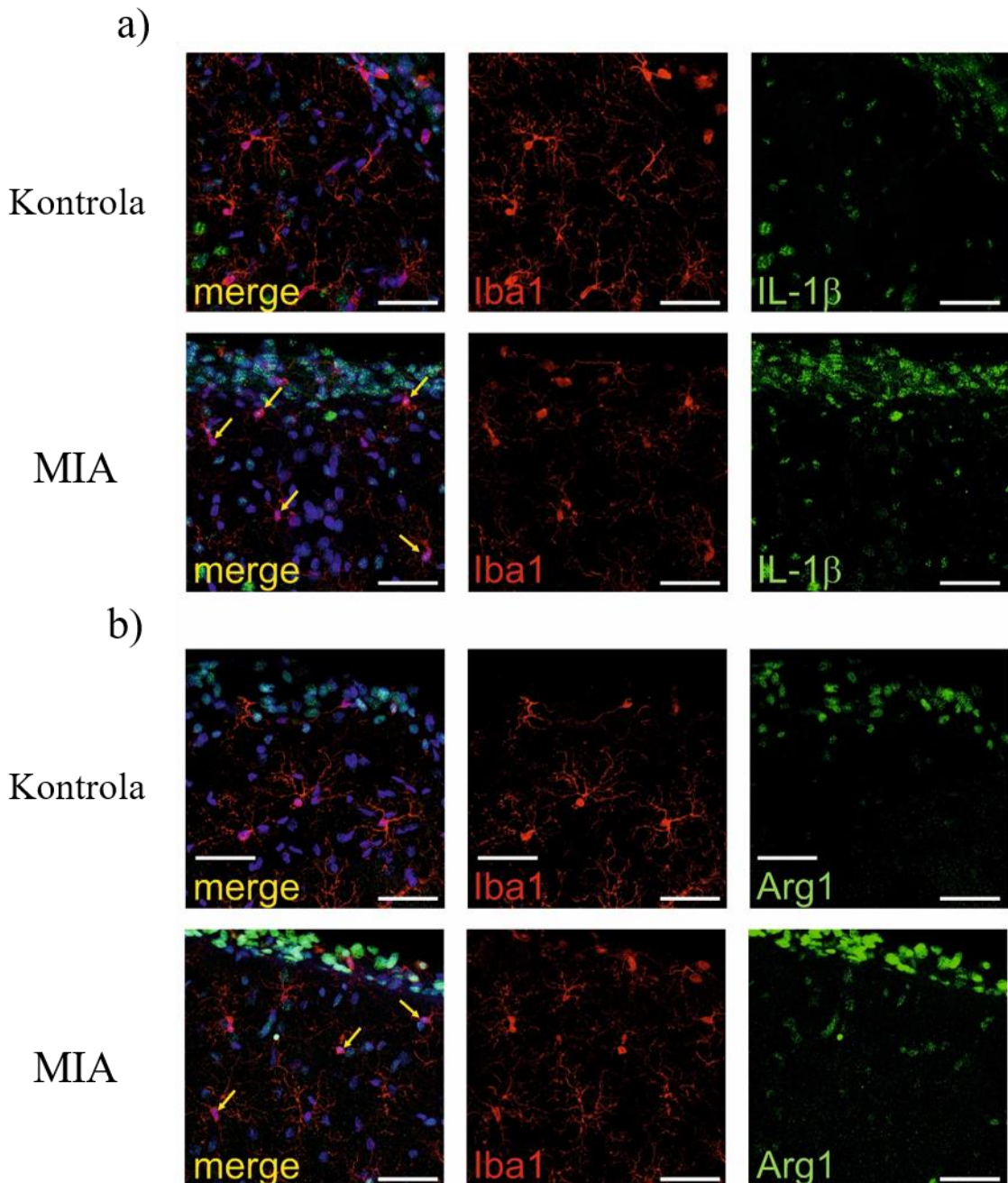
Cytokiny prozapalne mogą indukować ekspresję cyklooksygenazy-2 (COX-2). COX-2 oraz lipoksygenazy (LOX), w tym 12-LOX, są zaangażowane w przebieg procesów zapalnych, a reakcje przez nie katalizowane są źródłem RFT. Wobec tego zaobserwowany około 40% wzrost ekspresji genu *Ptgs2* (dla COX-2) oraz *Alox12* (dla 12-LOX) może wskazywać na aktywację procesów prozapalnych i stresu oksydacyjnego w korze mózgu młodych zwierząt potomnych z grupy MIA (Rycina 35a). W hipokampie nie odnotowano zmian w ekspresji badanych genów związanych z aktywacją procesów prozapalnych (Rycina 35b).

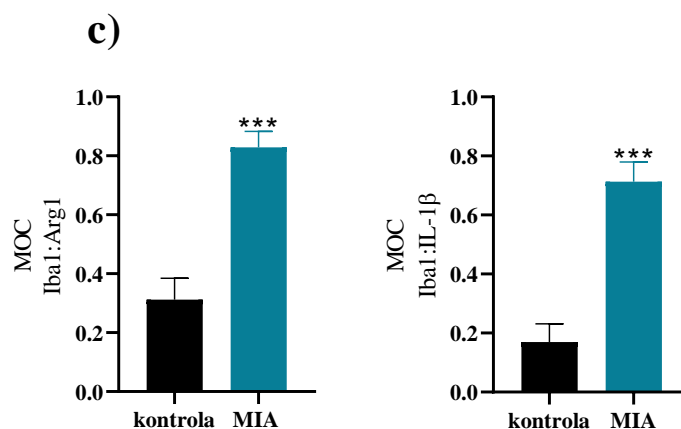


Rycina 35. Analiza ekspresji genów dla cyklooksyzgenazy-2 i lipooksyzgenazy-12 w korze mózgu i hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. a) Poziom ekspresji genów *Ptgs2* i *Alox12* w korze mózgu, normalizowany względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 3-4 eksperymentów ($n = 4$ i 3); **b)** Poziom ekspresji genów *Ptgs2* i *Alox12* w hipokampie, normalizowany względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 3 eksperymentów ($n = 3$); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

Zwiększona ekspresja cytokin w mózgu jest ściśle związana z aktywacją mikrogleju. W przeszłości wyróżniano dwa podstawowe rodzaje aktywacji mikrogleju, tak zwaną „klasyczną” oraz „alternatywną”. „Klasyczna”, prozapalna aktywacja mikrogleju (M1) jest związana z odpowiedzią na neuroinfekcje [Soares & Vieira, 2022]. „Alternatywnie” pobudzony mikroglej w stadium M2 charakteryzuje się wysoką ekspresją arginazy 1 (Arg-1) oraz wykazuje podwyższoną ekspresję cytokin uznawanych za przeciwzapalne (np. IL-10) [Saitgareeva *et al.*, 2020]. W rzeczywistości jednak, istnieje szerokie spektrum profilów aktywacyjnych i fenotypowych mikrogleju, a polaryzacja w kierunku pro- lub przeciwzapalnym jest bardzo dynamiczna, zwłaszcza w odniesieniu do chorób neurorozwojowych [Ransohoff, 2016]. Analiza immunohistochemiczna w korze mózgu

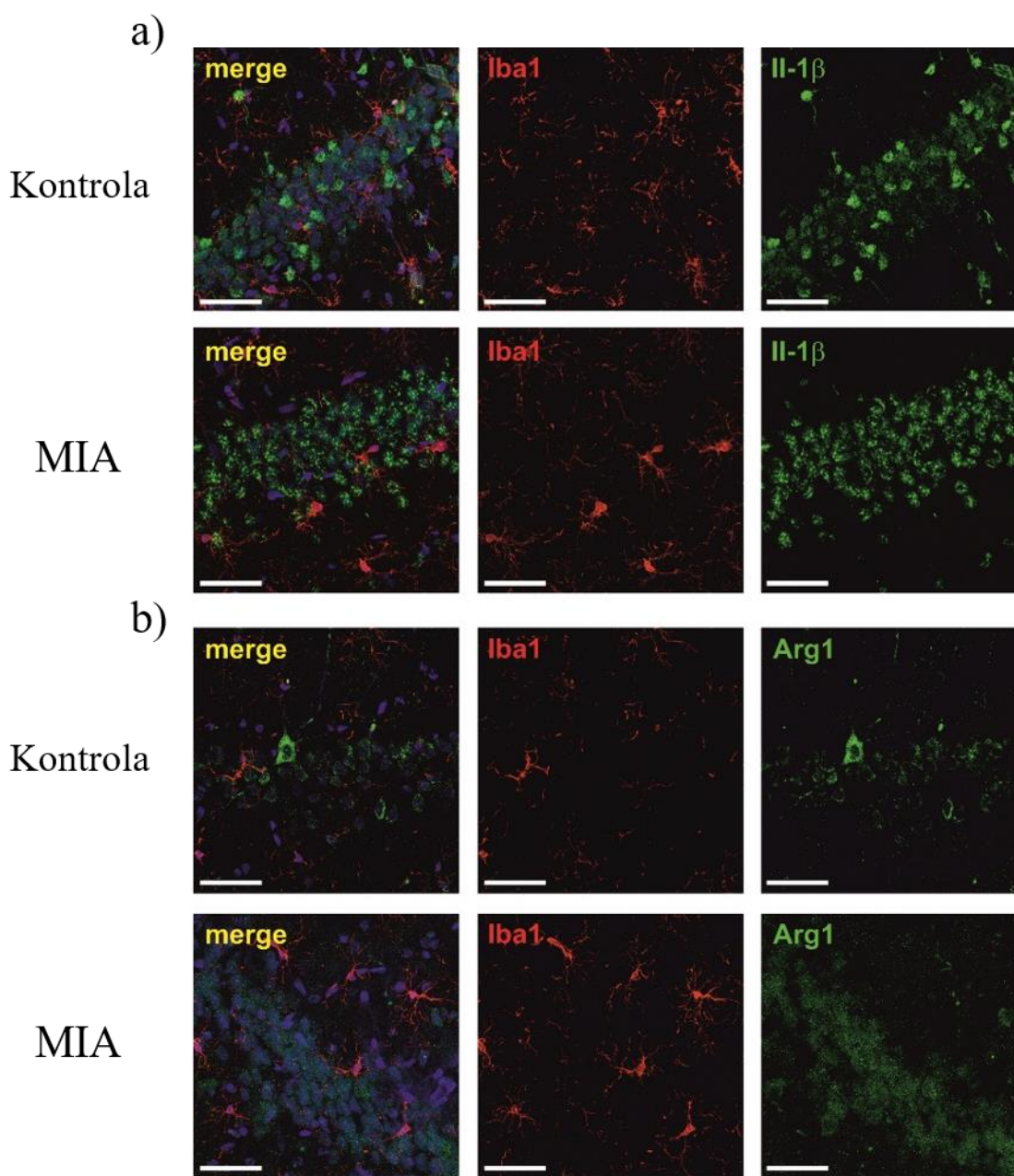
młodych zwierząt potomnych z grupy MIA wykazała kolokalizację białka markerowego mikrogleju Iba-1 z markerem fenotypu M1, IL-1 β (Rycina 36a i c) jak również z białkiem markerowym fenotypu M2, Arg-1 (Rycina 36b i c), co wskazuje na obecność aktywnego mikrogleju, zarówno w fazie M1 prozapalnej jak i puli M2 o potencjale przeciwzapalnym.





Rycina 36. Analiza ekspresji markerów aktywacji mikrogleju IL-1β i Arg1 oraz ich kolokalizacji z markerem Iba1 w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Immunohistochemiczna analiza kory mózgu ilustrująca komórki mikrogleju (Iba1, czerwony); **a)** Ekspresja markera aktywacji M1 - IL-1β (zielony); **b)** Ekspresja markera aktywacji M2 - Arg-1 (zielony). Kolokalizacja markerów została zaznaczona żółtymi strzałkami. Jądra komórkowe zabarwiono z pomocą DAPI (niebieski). Pasek skali = 50 μm. Zdjęcia reprezentatywne; **c)** Analiza współczynnika MOC (ang. Mander's overlap coefficient), wykonana automatycznie z pomocą oprogramowania ZEN (Iba1:Arg n = 34, Iba1:IL-1β n = 41); *** $p < 0.001$ w stosunku do kontroli, test *t*-Studenta.

Analogiczną analizę przeprowadzono w hipokampie, jednak w tej strukturze mózgu nie zaobserwowano kolokalizacji markera mikrogleju Iba1 ani z Arg1 ani z IL-1β (Rycina 37a i b). Otrzymany wynik, w połączeniu z brakiem ekspresji cytokin prozapalnych w tej strukturze mózgu (Rycina 34b i 35b) wskazuje na brak aktywacji mikrogleju w hipokampie młodych zwierząt potomnych z grupy MIA.

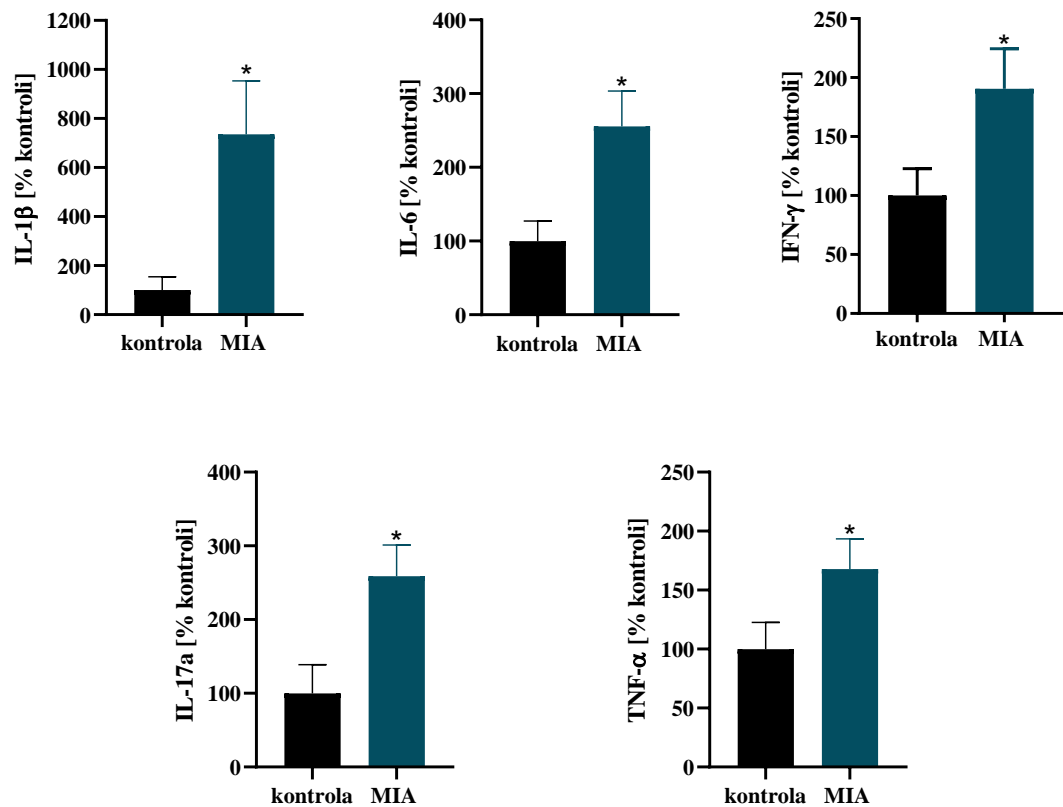


Rycina 37. Analiza ekspresji markerów aktywacji mikrogleju IL-1 β i Arg1 w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Immunohistochemiczna analiza hipokampa ilustrująca komórki mikrogleju (Iba1, czerwony); **a)** Ekspresja markera aktywacji M1 - IL-1 β (zielony); **b)** Ekspresja markera aktywacji M2 - Arg-1 (zielony). Brak widocznej kolokalizacji. Jądra komórkowe zabarwiono z pomocą DAPI (niebieski). Pasek skali = 50 μ m. Zdjęcia reprezentatywne.

10.5.2. Poziom cytokin prozapalnych w surowicy

Mimo istnienia BBB, OUN nie jest rejonem całkowicie odizolowanym od układu immunologicznego na obwodzie, a niektóre cytokiny mogą być transportowane przez BBB [Konsman, 2022]. Cytokiny takie mogą wpływać między innymi na funkcjonowanie

mikrogleju [Sun *et al.*, 2022]. W niniejszej pracy zaobserwowano wzrost poziomu IL-1 β , IFN- γ , IL-6, TNF- α oraz IL-17a, odpowiednio o 635%, 90%, 155%, 67% i 159% we krwi młodych zwierząt potomnych po prenatalnej ekspozycji na MIA (Rycina 38), co sugeruje podwyższoną aktywność układu odpornościowego w organizmie.

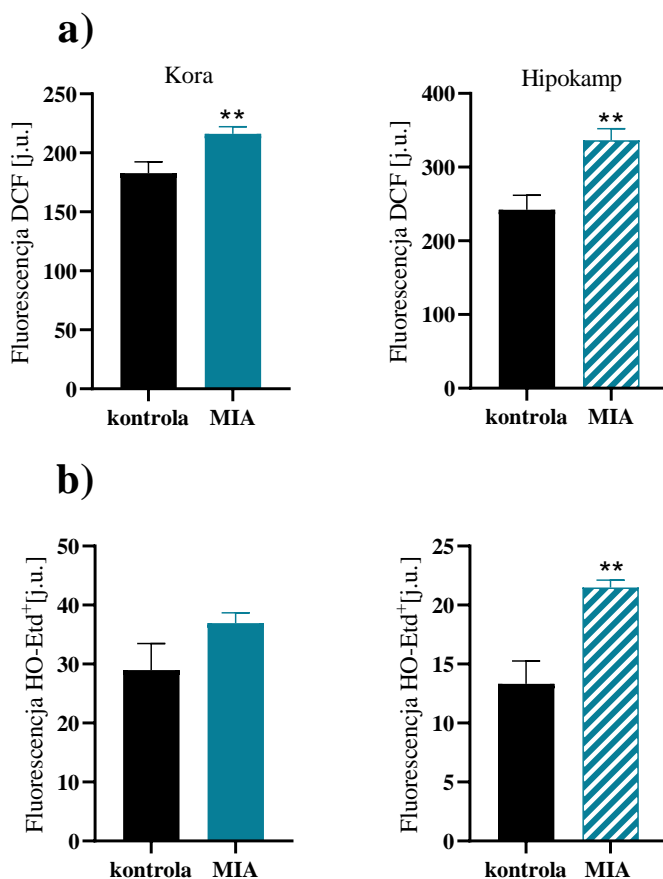


Rycina 38. Analiza poziomu cytokin prozapalnych w surowicy młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Poziom cytokin prozapalnych IL-1 β , IL-6, IFN γ , TNF α , IL-17a, mierzony z pomocą zestawu Bio Plex Pro Rat Cytokine 23-Plex. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 6-14 eksperymentów (n = 6 i 10, n = 6 i 12, n = 7 i 14, n = 6 i 9, n = 6 i 10); *p<0,05 w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

Podsumowując, badania wykazały, iż w mózgu młodych zwierząt po prenatalnej ekspozycji na MIA dochodzi do aktywacji mikrogleju i wzrostu ekspresji mediatorów procesu zapalnego w sposób zależny od struktury mózgu. Ze względu na istotny wzrost poziomu cytokin prozapalnych we krwi obwodowej zwierząt z grupy MIA nie można wykluczyć, iż przyczyną aktywacji mikrogleju w korze mózgu są mediatory prozapalne pochodzące z krwioobiegu.

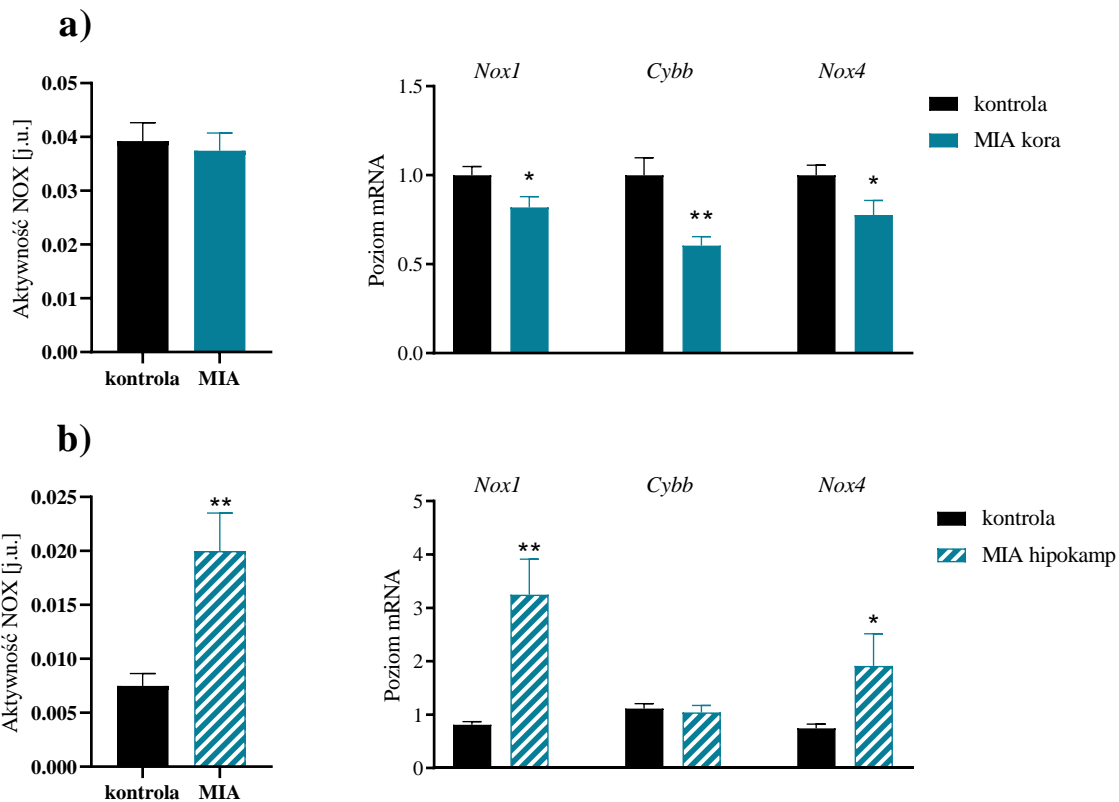
10.6. Wpływ MIA na poziom reaktywnych form tlenu oraz markery stresu oksydacyjnego w mózgu młodych zwierząt potomnych

Jak opisano szerzej we Wstępie, wiele jest powiązań między stresem oksydacyjnym a stanem zapalnym, również w kontekście ASD. Podobnie jak na wcześniejszych etapach życia, również u 52-54-dniowych zwierząt zbadano poziom RFT. Badania z zastosowaniem sondy H₂DCF-DA wykazały wzrost poziomu RFT zarówno w korze mózgu (o 18%) jak i w hipokampie (o 40%) młodych zwierząt potomnych z grupy MIA (Rycina 39a), chociaż w tej drugiej strukturze mózgu nie zaobserwowano aktywacji mikrogleju i wzrostu ekspresji mediatorów prozapalnych. Analiza poziomu anionorodnika ponadtlenkowego O₂^{•-} z zastosowaniem pomiaru fluorescencji HE wykazała istotny jego wzrost, o 61% w hipokampie młodych zwierząt potomnych z grupy MIA, natomiast w korze mózgu wykazano jedynie tendencję wzrostową (Rycina 39b).



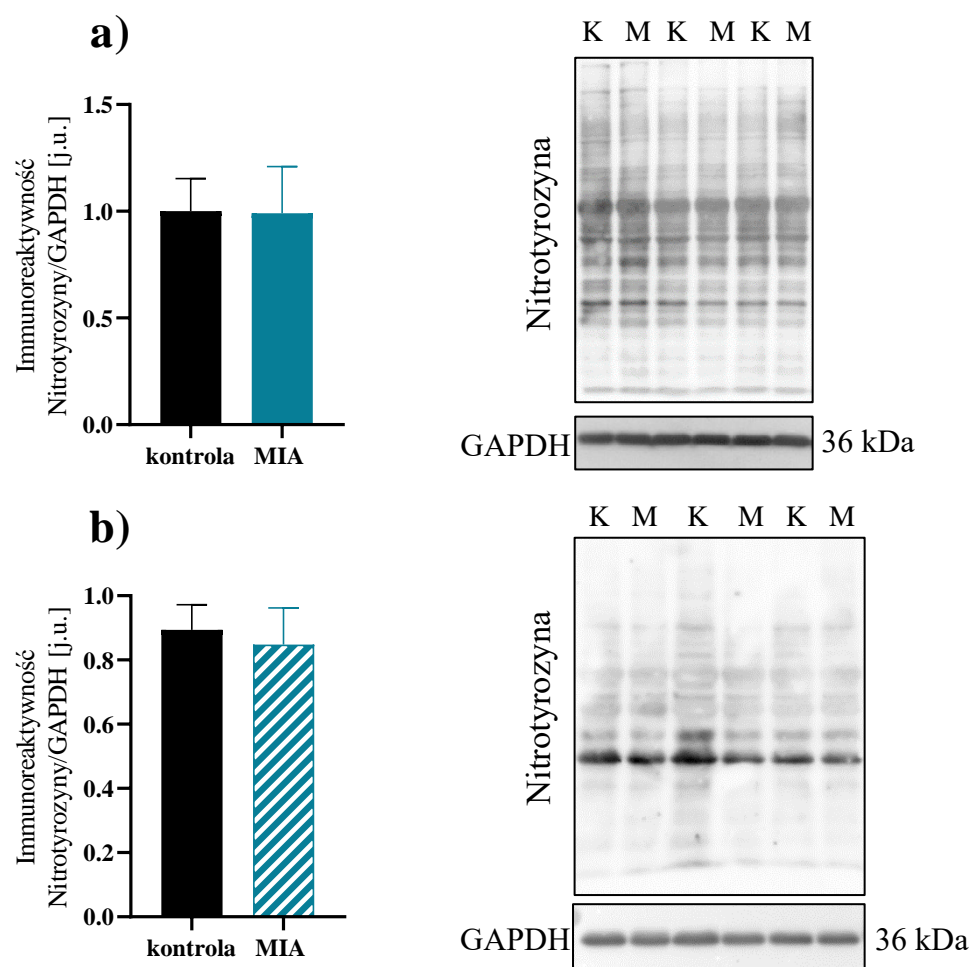
Rycina 39. Analiza poziomu RFT w korze mózgu oraz hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. a) Uwalnianie reaktywnych form tlenu w korze mózgu i hipokampie mierzone z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej H₂DCF-DA. Prezentowane dane to średnie ± SEM pochodzące z 8 eksperymentów (n = 8); **b)** Generacja O₂^{•-} mierzona była z pomocą metody fluorymetrycznej, z wykorzystaniem dihydroetydyny. Prezentowane dane to średnie ± SEM pochodzące z 4 eksperymentów (n = 4); **p<0.01 w stosunku do kontroli, test *t*-Studenta.

Jak wykazano, w mózgu osesków z grupy MIA istotnym źródłem O₂^{•-} może być oksydaza NADPH. Dlatego w mózgu młodych zwierząt potomnych zbadano aktywność oraz ekspresję genów dla trzech izoform tego enzymu. W hipokampie odnotowano znaczący wzrost aktywności oksydazy NADPH o 170% w stosunku do kontroli (Rycina 40c) wraz ze wzrostem ekspresji *Nox1* i *Nox4*, odpowiednio o 300% i 158% (Rycina 40d). W korze mózgu nie zaobserwowano różnicy w aktywności oksydazy NADPH w stosunku do kontroli (Rycina 40a). Co więcej, wykazano spadek ekspresji *Nox1*, *Cybb* i *Nox4*, odpowiednio o 19%, 41% i 23% (Rycina 40b).



Rycina 40. Analiza poziomu aktywności i ekspresji oksydazy NADPH w korze mózgu oraz hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. a) Aktywność oksydazy NADPH w korze mózgu. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące 6-9 eksperymentów ($n = 9 - 6$); Poziom ekspresji genów *Nox1*, *Cybb* i *Nox4* w korze mózgu, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące 5-6 eksperymentów ($n = 5 - 6$); **b)** Aktywność oksydazy NADPH w hipokampie. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 8-9 eksperymentów ($n = 9 - 8$); Poziom ekspresji genów *Nox1*, *Cybb* i *Nox4* w hipokampie, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące 5-6 eksperymentów ($n = 5 - 6$); * $p < 0,05$, ** $< 0,01$ w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

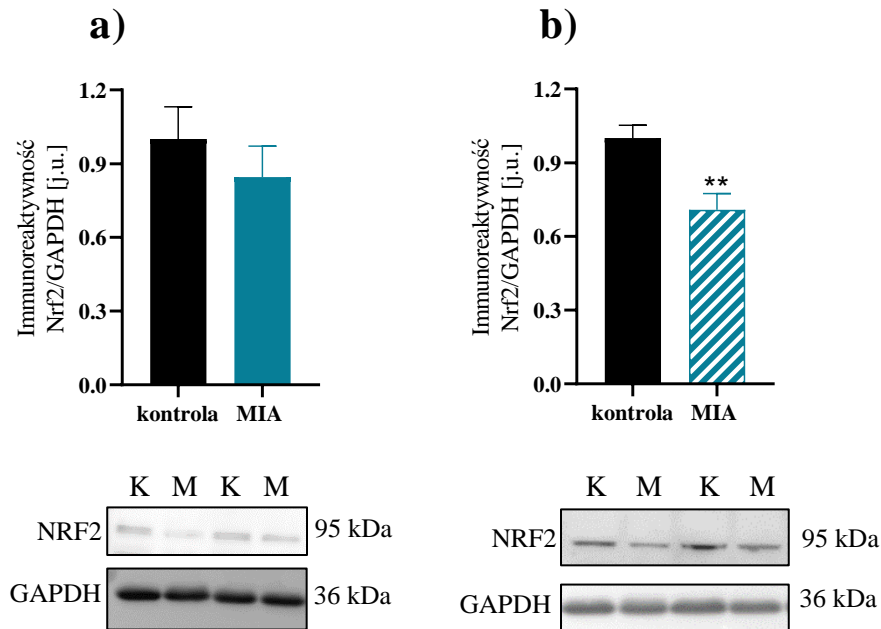
Analogicznie jak w przypadku 7-dniowych osesków z grupy MIA, w mózgu młodych zwierząt potomnych nie odnotowano zmian w poziomie nitrotyrozyny (Rycina 41a i b), co sugeruje, że reaktywne formy azotu nie są zaangażowane w generację stresu oksydacyjnego.



Rycina 41. Analiza poziomu nitrotyrozyny w korze mózgu oraz hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. a) Stosunek immunoreaktywności nitrotyrozyny do GAPDH w korze mózgu. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 7 eksperymentów ($n = 7$); b) Stosunek immunoreaktywności nitrotyrozyny do GAPDH w hipokampie. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 6 eksperymentów ($n = 6$). Zdjęcia reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

Neutralizacja nadmiaru wolnych rodników odbywa się dzięki systemowi antyoksydacyjnemu, który obejmuje działanie enzymatycznych i nieenzymatycznych przeciwutleniaczy. W przeciwieństwie do wyników badań uzyskanych z mózgu 7-dniowych szczurów z grupy MIA, które wykazały wzrost poziomu czynnika transkrypcyjnego Nrf2 oraz zwiększoną ekspresję genów kodujących podległe mu enzymy antyoksydacyjne, w mózgu młodych zwierząt zaobserwowano obniżony poziom Nrf2, w hipokampie o około 30% (Rycina 42b), natomiast w korze mózgu wykazano tendencję spadkową w poziomie tego białka w stosunku do kontroli (Rycina 42a). Ponadto, w hipokampie odnotowano niewielki, ale istotny statystycznie spadek ekspresji *Sod1*

i *Sod2* (Tabela V), natomiast w korze mózgu ekspresja *Sod2* spadała o 25% (Tabela V), co wskazuje na upośledzenie systemu enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej w obu strukturach mózgu młodych zwierząt potomnych po prenatalnej ekspozycji na MIA.

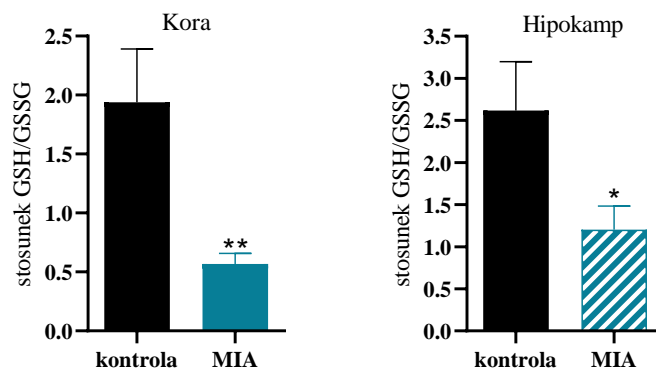


Rycina 42. Poziom białka Nrf2 w korze mózgu i hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. a) Stosunek immunoreaktywności białka Nrf2 do GAPDH w korze mózgu. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące 7-8 eksperymentów ($n = 7 - 8$); **b)** Stosunek immunoreaktywności białka Nrf2 do GAPDH w hipokampie. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące 8-9 eksperymentów ($n = 8 - 9$); ** $p < 0,01$ w stosunku do kontroli, test *t*-Studenta. Zdjęcia reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

Tabela V. Ekspresja wybranych genów związanych z systemem antyoksydacyjnym w korze mózgu i hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Poziom ekspresji genów *Sod1*, *Sod2*, *Cat*, *Gpx1* i *Gpx4* w korze mózgu i hipokampie, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące 5 eksperymentów (n = 5); *p<0,05 w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

mRNA	Kora mózgu		Hipokamp	
	Kontrola	MIA	Kontrola	MIA
<i>Sod1</i>	1,01 \pm 0,04	0,84 \pm 0,09	1,03 \pm 0,03	0,95 \pm 0,02 *
<i>Sod2</i>	0,91 \pm 0,03	0,68 \pm 0,08 *	1,04 \pm 0,02	0,97 \pm 0,02 *
<i>Cat</i>	1,04 \pm 0,03	1,01 \pm 0,06	0,96 \pm 0,02	0,96 \pm 0,04
<i>Gpx1</i>	1,05 \pm 0,04	1,13 \pm 0,05	1,08 \pm 0,03	1,24 \pm 0,07
<i>Gpx4</i>	1,01 \pm 0,03	1,12 \pm 0,06	1,17 \pm 0,04	1,10 \pm 0,06

GSH jest najważniejszym nieenzymatycznym, antyoksydantem. Glutation w mózgu występuje głównie w postaci zredukowanej (GSH), jedynie 0,2% występuje w formie utlenionego disulfidu (GSSG). Stosunek stężeń GSH do GSSG jest dobrym wskaźnikiem poziomu stresu oksydacyjnego oraz ogólnego stanu wewnątrzkomórkowego środowiska oksydacyjno-redukcyjnego [Zitka *et al.*, 2012]. W korze mózgu i w hipokampie młodych zwierząt potomnych z grupy MIA wykazano spadek stosunku GSH/GSSG odpowiednio o 71% i 55% (Rycina 43), potwierdzając tym samym obecność stresu oksydacyjnego w badanych strukturach mózgu.



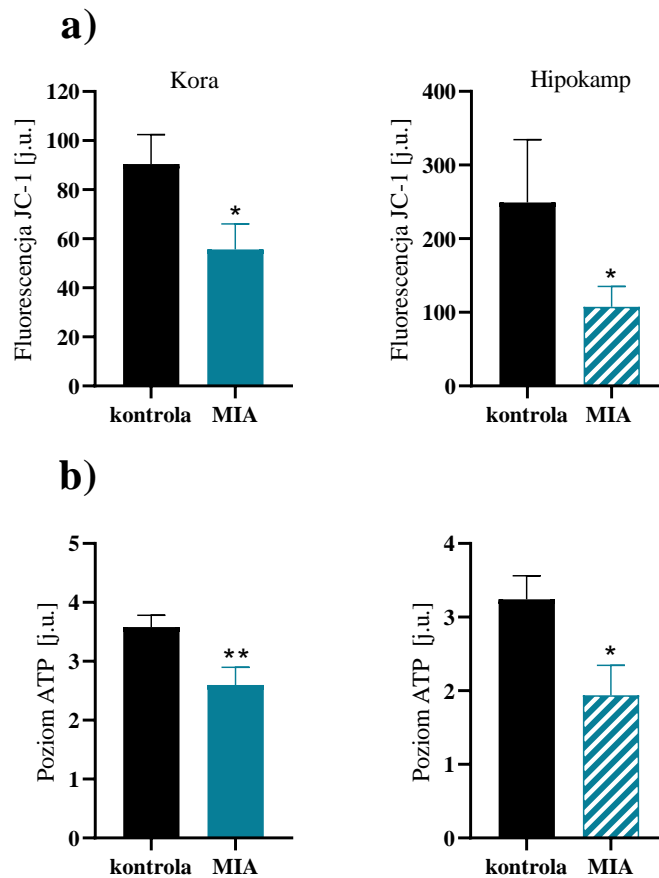
Rycina 43. Pomiar stosunku zredukowanej formy glutationu do jego formy utlenionej w korze mózgu i hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Stosunek GSH/GSSG mierzony z pomocą zestawu Glutathione Assay Kit metodą spektrofotometryczną, w korze mózgu i hipokampie. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące 4-6 eksperymentów ($n = 4 - 6$); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ w stosunku do kontroli, test *t*-Studenta.

Podsumowując, wykazano, że w mózgu młodych zwierząt po prenatalnej ekspozycji na MIA wzrasta poziom RFT. Źródłem $O_2^{\cdot-}$ w hipokampie jest prawdopodobnie oksydaza NADPH, która w korze mózgu nie jest aktywowana. W obu strukturach mózgu spada stosunek GSH/GSSG oraz wydolność enzymatycznego systemu obrony antyoksydacyjnej.

10.7. Wpływ MIA na funkcjonowanie mitochondriów w mózgu młodych zwierząt potomnych

10.7.1. Zaburzenia mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów

Jak już wspomniano wcześniej, aktywacja mikrogleju i toczące się procesy prozapalne oraz stres oksydacyjny mogą zaburzać funkcjonowanie mitochondriów. Uszkodzenia tych organelli w mózgu młodych zwierząt z grupy MIA w porównaniu do tych obserwowanych u 7-dniowych osesków są znacznie poważniejsze. W korze mózgu oraz w hipokampie młodych zwierząt z grupy MIA odnotowano odpowiednio 40% i 50% spadek $\Delta\Psi_m$ (Rycina 44a), a także spadek poziomu ATP o 28% w korze mózgu i o 40% w hipokampie w stosunku do kontroli (Rycina 44b).



Rycina 44. Analiza funkcji mitochondriów w korze oraz hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. a) Mitochondrialny potencjał błonowy, mierzony z zastosowaniem pomiaru fluorescencji sondy JC-1 w korze mózgu i hipokampie. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące 5-9 eksperymentów ($n = 5 - 9$); **b)** Poziom ATP mierzony z zastosowaniem pomiaru luminescencji w korze mózgu i hipokampie. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące 9-11 eksperymentów ($n = 9 - 11$); * $p < 0,05$, ** $< 0,01$ w stosunku do kontroli, test *t*-Studenta.

Ponadto, w korze mózgu młodych zwierząt MIA odnotowano spadek ekspresji genów dla podjednostek kompleksów CI, CIII i CIV, odpowiednio o 18% genu *mt-Nd1* (podjednostka CI), o 22% genu *mt-Cyb* (podjednostka CIII) oraz o 23% genu *mt-Co1* (podjednostka CIV) (Tabela VI). Jednocześnie spada aktywność tych samych kompleksów, CI o 22%, CIII, o 69%, oraz CIV o 19% w porównaniu do zwierząt kontrolnych (Tabela VI).

Tabela VI. Analiza ekspresji oraz aktywności białek łańcucha oddechowego w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Poziom ekspresji genów *mt-Nd1*, *mt-Sdha*, *mt-Cyb* oraz *mt-Co1* w korze mózgu, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące 4-5 eksperymentów (n = 4 - 5); Poziom aktywności czterech kompleksów łańcucha oddechowego (CI, CII, CIII, CIV) w korze mózgu. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące 5-7 eksperymentów (n = 7, n = 5, n = 5, n = 7); *p<0,05, ***p<0,001 w stosunku do kontroli, test t-Studenta.

Kompleks	Kora mózgu			
	Ekspresja		Aktywność	
	Kontrola	MIA	Kontrola	MIA
I (<i>mt-Nd1</i>)	1,00 \pm 0,05	0,82 \pm 0,06 *	1,00 \pm 0,06	0,78 \pm 0,05 *
II (<i>mt-Sdha</i>)	1,00 \pm 0,02	0,98 \pm 0,04	1,00 \pm 0,08	0,93 \pm 0,02
III (<i>mt-Cyb</i>)	1,00 \pm 0,05	0,78 \pm 0,07 *	1,00 \pm 0,10	0,31 \pm 0,13 *
IV (<i>mt-Co1</i>)	1,00 \pm 0,02	0,77 \pm 0,03 ***	1,00 \pm 0,06	0,81 \pm 0,05 *

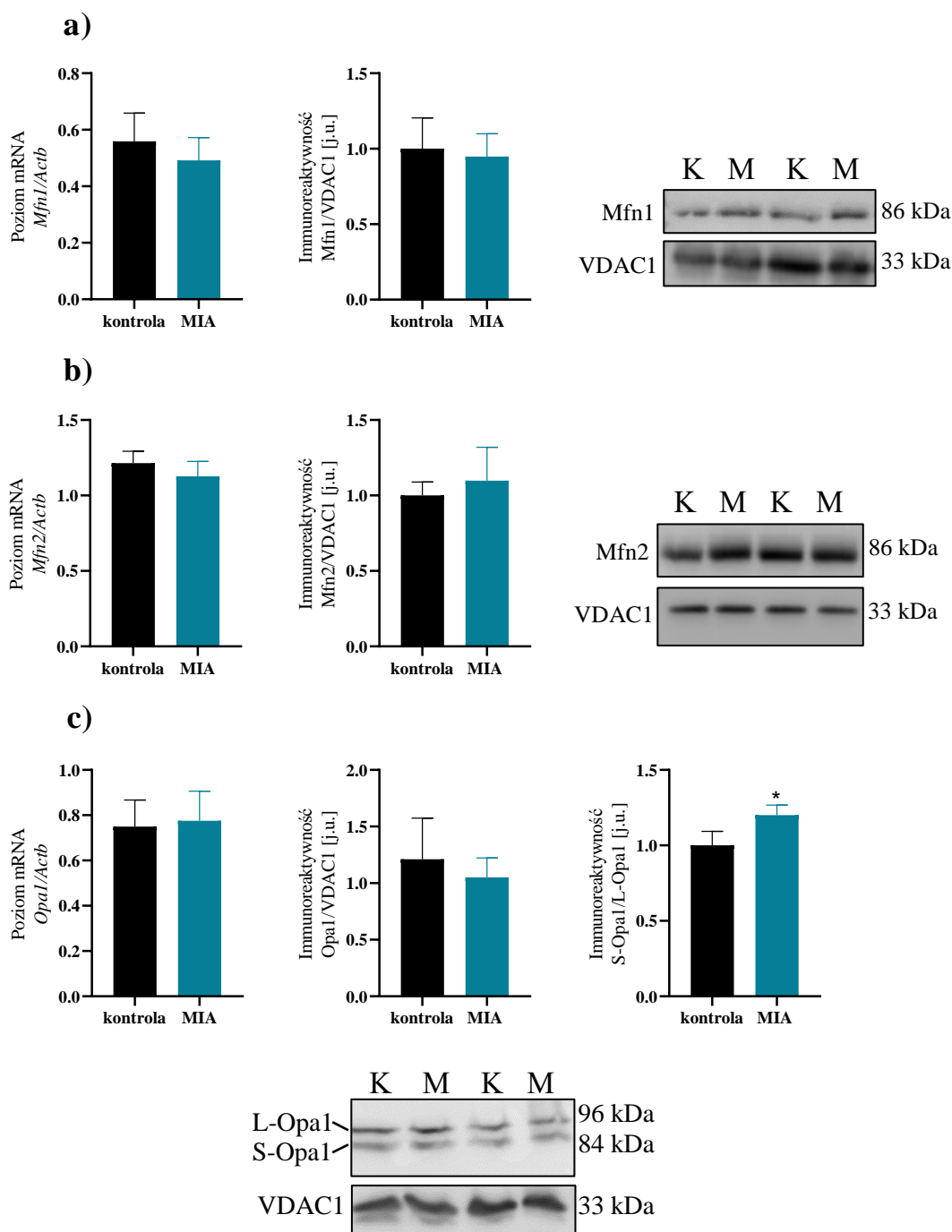
W hipokampie zaobserwowano mniej spektakularne zmiany niż w korze mózgu, wykazano spadek ekspresji genów dla CI oraz CIV, odpowiednio *mt-Nd1* o 26% i *mt-Co1* o 19%, podczas gdy ekspresja CII i CIII nie zmieniała się (Tabela VII). Spadek aktywności zaobserwowano w przypadku CI o 26% oraz CIII o 74% w porównaniu do zwierząt kontrolnych (Tabela VII).

Tabela VII. Analiza ekspresji oraz aktywności białek łańcucha oddechowego w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Poziom ekspresji genów *mt-Nd1*, *mt-Sdha*, *mt-Cyb* oraz *mt-Co1* w hipokampie, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące 4-5 eksperymentów (n = 4 - 5); Poziom aktywności czterech kompleksów łańcucha oddechowego (CI, CII, CIII, CIV) w hipokampie. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące 5-8 eksperymentów (n = 8, n = 5, n = 5, n = 8); *p<0,05, **p<0,01 w stosunku do kontroli, test *t*-Studenta.

Hipokamp				
Kompleks	Ekspresja		Aktywność	
	Kontrola	MIA	Kontrola	MIA
I (<i>mt-Nd1</i>)	1,00 \pm 0,04	0,09 \pm 0,05 **	1,00 \pm 0,10	0,73 \pm 0,08 *
II (<i>mt-Sdha</i>)	1,00 \pm 0,04	0,96 \pm 0,06	1,00 \pm 0,07	1,07 \pm 0,13
III (<i>mt-Cyb</i>)	1,00 \pm 0,05	1,01 \pm 0,15	1,00 \pm 0,13	0,29 \pm 0,05 **
IV (<i>mt-Co1</i>)	1,00 \pm 0,08	0,81 \pm 0,03 *	1,00 \pm 0,04	1,05 \pm 0,04

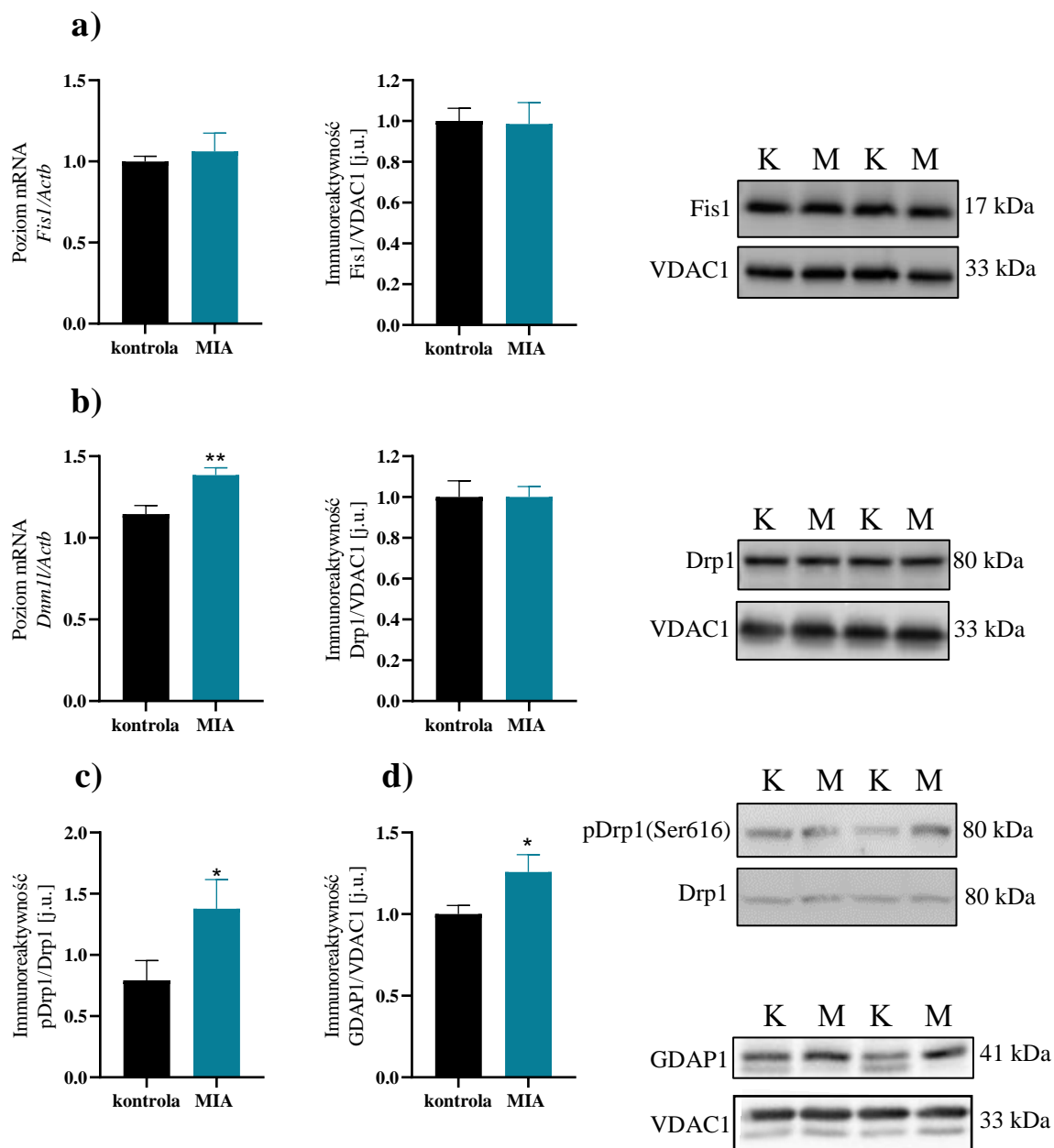
10.7.2. Zmiany białek regulujących fuzję i fragmentację mitochondriów

Analogicznie jak u 7-dniowych osesków, w korze mózgu i w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA zanalizowano ekspresję genów oraz poziom białek zaangażowanych w proces fuzji (*Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1*) i fragmentacji mitochondriów (*Drp1* i *Fis1*). W korze mózgu nie zaobserwowano zmian w ekspresji białek regulujących fuzję (Rycina 45a, b, c), podobnie nie zmienił się poziom tych białek. Wykazano natomiast wzrost o 20% stosunku S-*Opa1*/L-*Opa1* (Rycina 45c), co sugeruje zahamowanie fuzji mitochondriów i przechylenie szali na korzyść fragmentacji.



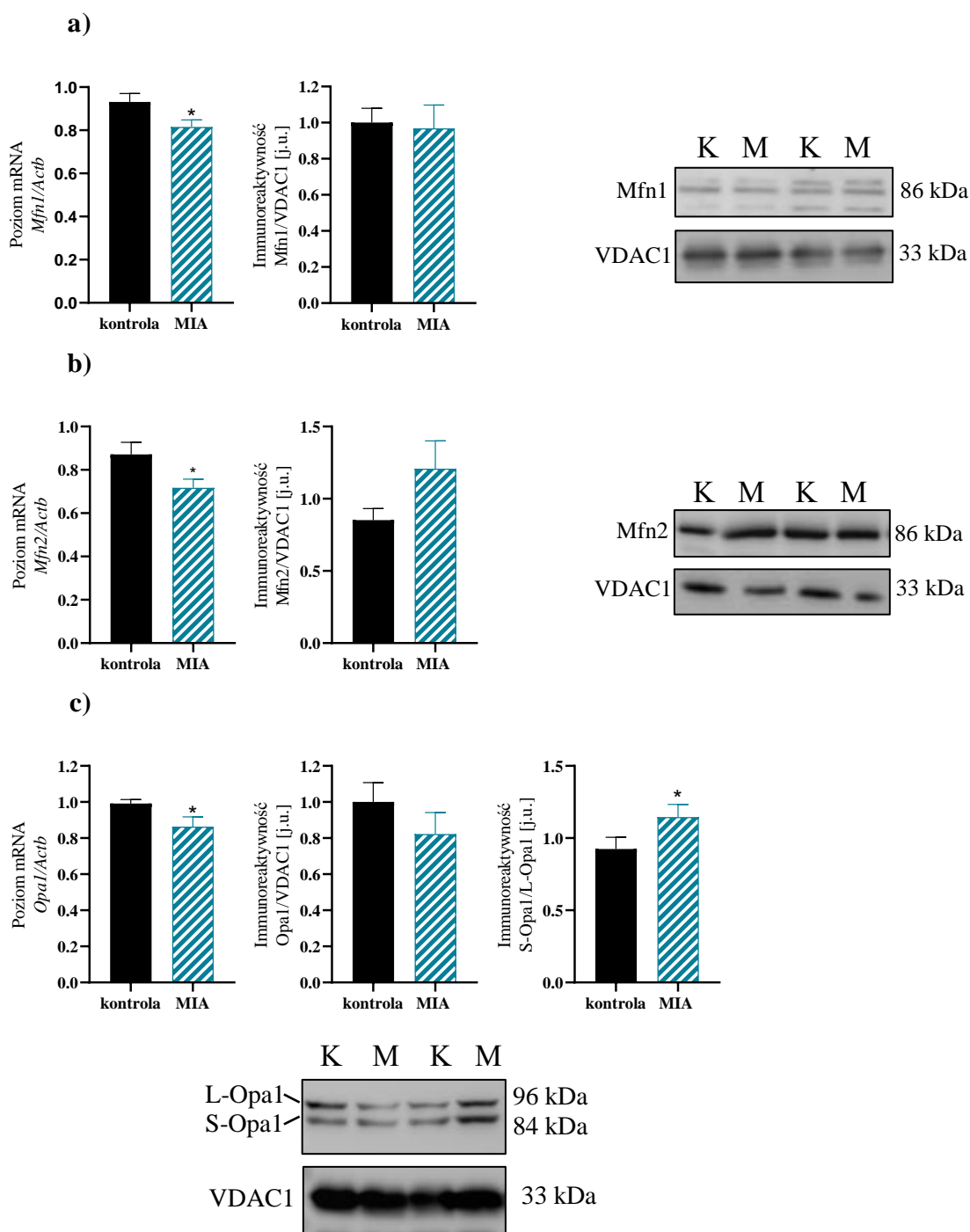
Rycina 45. Analiza ekspresji i poziomu białek związanych z fuzją mitochondriów w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Poziom ekspresji *Mfn1* (a), *Mfn2* (b) i *Opa1* (c) w korze mózgu, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 4-6 eksperymentów ($n = 4 - 6$); stosunek immunoreaktywności białka Mfn1 (a), Mfn2 (b) i Opa1 (c) do VDAC1 oraz stosunek S-Opa1/L-Opa1 (c) w mitochondriach izolowanych z kory mózgu. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5-7 eksperymentów ($n = 5 - 7$); * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta. Zdjęcia reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

Chociaż nie wykazano zmian w ekspresji genu *Fis1* i w poziomie białka *Fis1* (Rycina 46a), to odnotowano wzrost ekspresji genu *Dnm1l* dla białka *Drp1* o 21% (Rycina 46b). Ponadto, wzrost stosunku p-*Drp1*(Ser616)/*Drp1* wskazuje na zwiększoną fosforylację tego białka na serynie 616 i jego translokację z cytoplazmy do zewnętrznej błony mitochondrialnej, co jest warunkiem koniecznym do przeprowadzenia procesu fragmentacji mitochondriów (Rycina 46c). W celu potwierdzenia aktywacji procesu fragmentacji zbadano poziom białka zewnętrznej błony mitochondrialnej, *GDAP1* (ang. ganglioside induced differentiation associated protein 1), które również związane jest z fragmentacją mitochondriów. Wykazano wzrost poziomu tego białka w stosunku do kontroli o 25% (Rycina 46d). Razem, uzyskane wyniki badań wskazują na zwiększoną fragmentację mitochondriów w korze mózgu młodych potomnych zwierząt MIA.

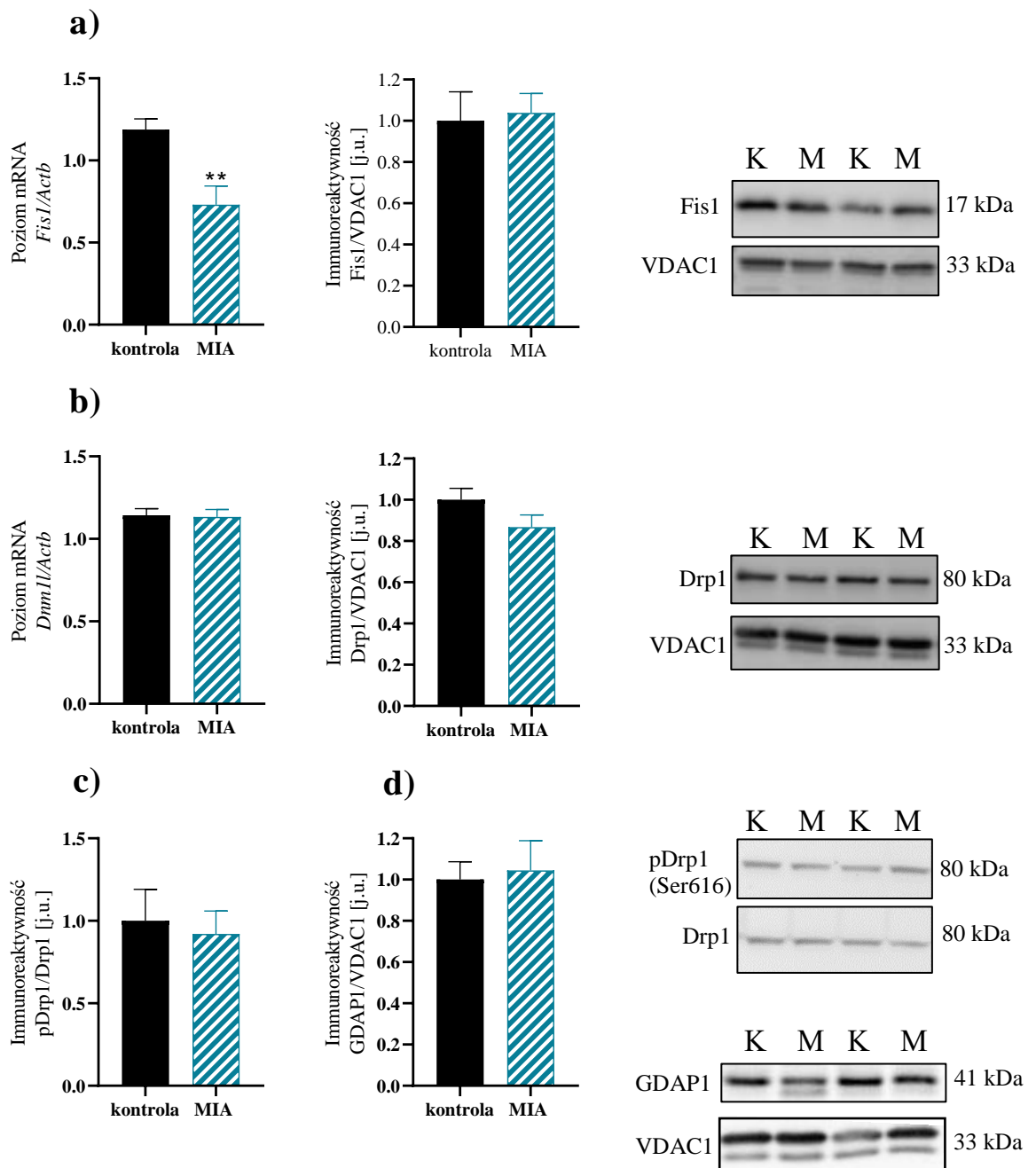


Rycina 46. Analiza ekspresji i poziomu białek związanych z fragmentacją mitochondriów w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Poziom ekspresji *Fis1* (a) i *Dnm1l* (b) w korze mózgu młodych dorosłych normalizowany względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 4-5 eksperymentów ($n = 4 - 5$); Stosunek immunoreaktywności białka *Fis1* (a), *Drp1* (b) oraz *GDAP1* (d) do *VDAC1* w mitochondriach izolowanych z kory mózgu. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 6-8 eksperymentów ($n = 6 - 8$); Stosunek *pDrp1*(Ser616) do *Drp1* (c) w korze mózgu. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 4 eksperymentów ($n = 4$); * $p < 0,05$ ** $< 0,01$ w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta. Zdjęcia reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

Natomiast w hipokampie zaobserwowano spadek ekspresji *Mfn1* (13%), *Mfn2* (18%), *Opal* (13%) oraz *Fis1* (39%) (Rycina 47a, b, c, Rycina 48a), jednak spadek ten nie miał odzwierciedlenia w poziomie białek, odnotowano jedynie wzrost stosunku S-Opal/L-Opal o 23% (Rycina 47c). Stosunek pDrp1/Drp1 oraz poziom białka GDAP1 nie zmieniały się (Rycina 48c i d).



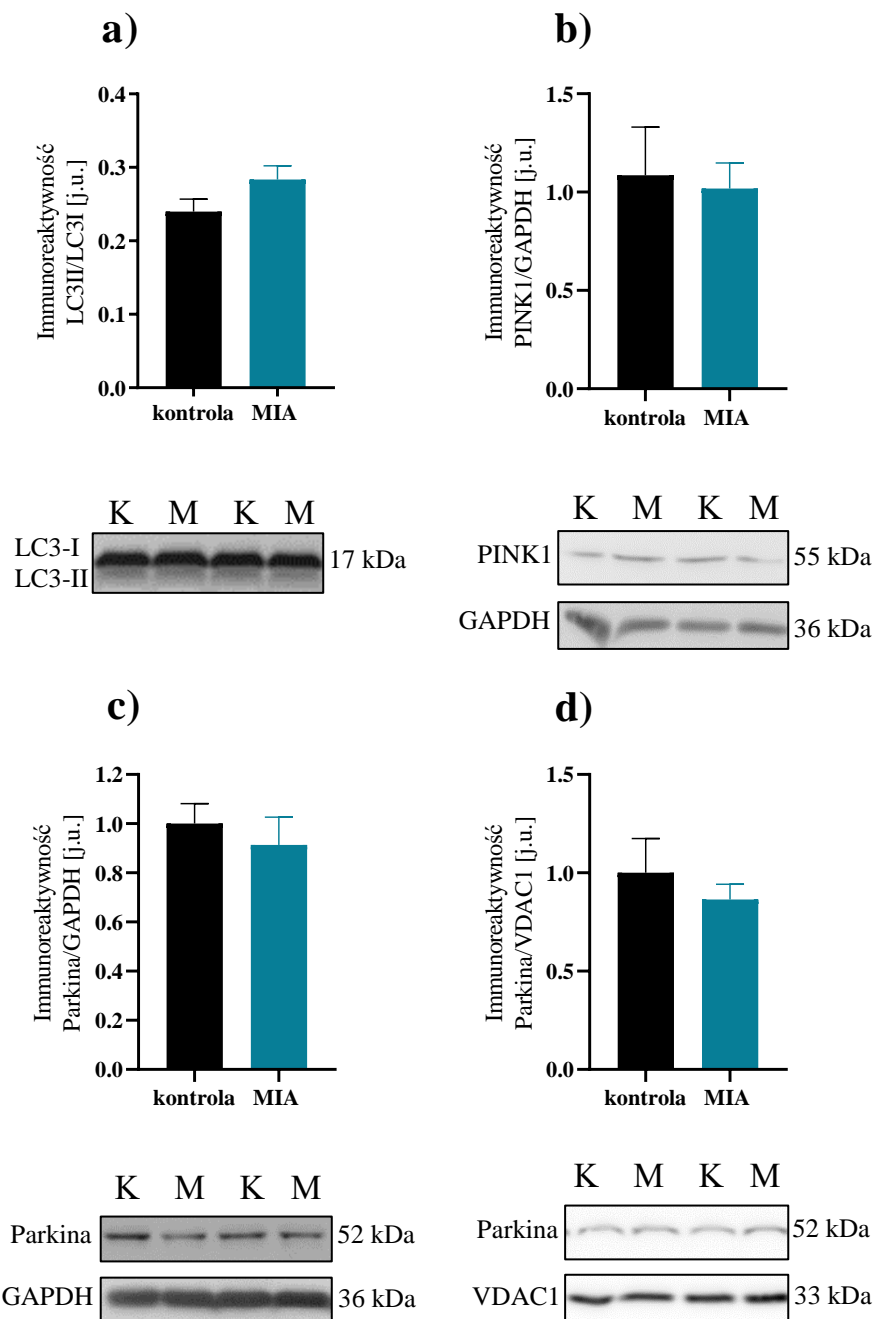
Rycina 47. Analiza ekspresji i poziomu białek związanych z fuzją mitochondriów w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Poziom ekspresji *Mfn1* (a), *Mfn2* (b) i *Opa1* (c) w hipokampie, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5 eksperymentów ($n = 5$); stosunek immunoreaktywności białka *Mfn1* (a), *Mfn2* (b) i *Opa1* (c) do *VDAC1* oraz stosunek *S-Opa1/L-Opa1* (c) w mitochondriach izolowanych z hipokampa. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 6-7 eksperymentów ($n = 6 - 7$); * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta. Zdjęcia reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.



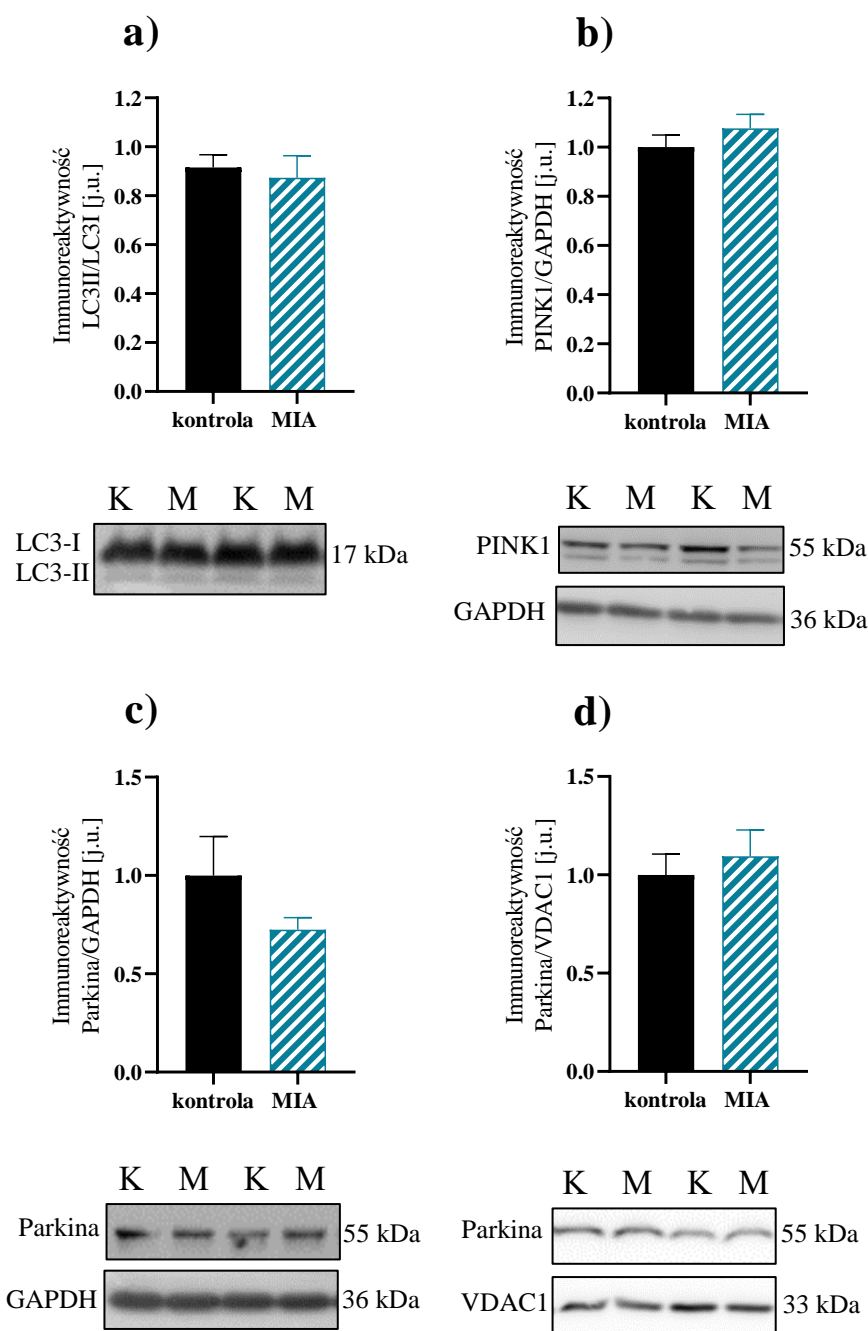
Rycina 48. Analiza ekspresji i poziomu białek związanych z fragmentacją mitochondriów w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Poziom ekspresji *Fis1* (a) i *Dnm1l* (b) w hipokampie, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 4-5 eksperymentów ($n = 4 - 5$); Stosunek immunoreaktywności białka *Fis1* (a), *Drp1* (b) oraz *GDAP1* (d) do *VDAC1* w mitochondriach izolowanych z hipokampa. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 6-9 eksperymentów ($n = 6 - 9$); Stosunek *pDrp1*(Ser616) do *Drp1* (c) w hipokampie. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5 eksperymentów ($n = 5$); * $p < 0,05$ ** $< 0,01$ w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta. Zdjęcia reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

10.7.3. Analiza białek regulujących mitofagię i biogenezę mitochondriów

Fragmentacja mitochondriów jest wstępnym etapem procesu mitofagii. Nawet przejściowy stres oksydacyjny może stymulować fragmentację, a następnie aktywację selektywnej autofagii mitochondriów [Frank *et al.*, 2012]. Dlatego, analogicznie jak w przypadku 7-dniowych osesków zbadano poziom kluczowych białek zaangażowanych w usuwanie dysfunkcyjnych mitochondriów na drodze autofagii w mózgu młodych zwierząt potomnych. Jednak poziom PINK1 i parkiny oraz LC-3 nie zmienił się ani w korze mózgu (Rycina 49a, b, c), ani w hipokampie (Rycina 50a, b, c) młodych zwierząt z grupy MIA w stosunku do kontroli. Nie wykazano również zmian poziomu parkiny w izolowanych mitochondriach z kory mózgu oraz z hipokampa (Rycina 49d i Rycina 50d), co dowodzi, że białko to nie jest rekrutowane do błony mitochondrialnej i nie naznacza białek mitochondrialnych do degradacji. Wyniki wskazują na brak aktywacji mitofagii w mózgu młodych zwierząt potomnych MIA pomimo znacznego uszkodzenia funkcji mitochondriów i ich zwiększonej fragmentacji, co może oznaczać iż dochodzi do akumulacji tych dysfunkcyjnych organelli.

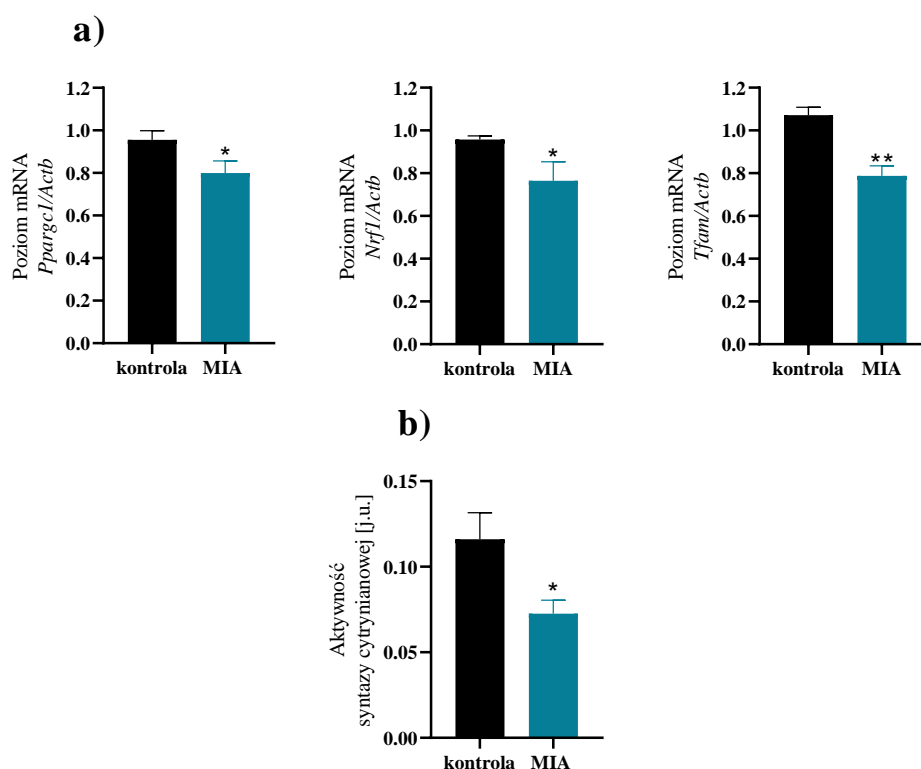


Rycina 49. Analiza poziomu białek związanych z mitofagią w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Stosunek immunoreaktywności LC3 (a), PINK1 (b) i parkiny (c) do GAPDH w korze mózgu. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5-7 eksperymentów ($n = 5 - 7$); Stosunek immunoreaktywności parkiny (d) do VDAC1 w izolowanych mitochondriach z kory mózgu. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5 eksperymentów ($n = 5$). Zdjęcia reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

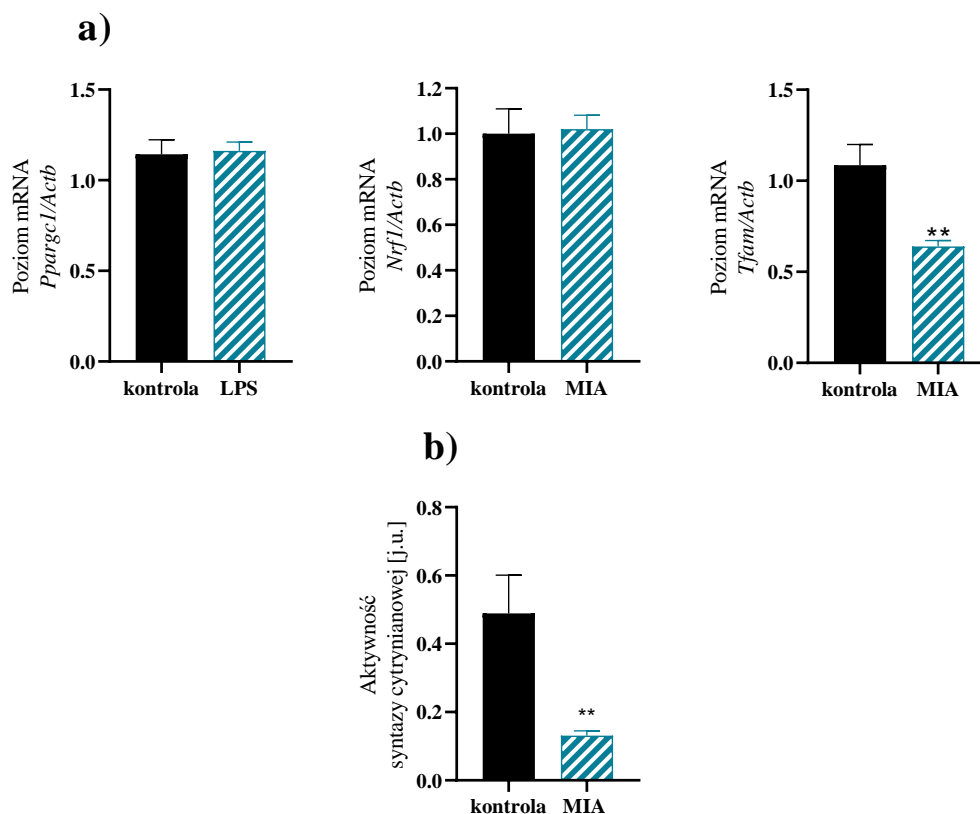


Rycina 50. . Analiza poziomu białek związanych z mitofagią w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Stosunek immunoreaktywności LC3 (a), PINK1 (b) i parkiny (c) do GAPDH w hipokampie młodych dorosłych. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5-6 eksperymentów (n = 5 - 6); Stosunek immunoreaktywności parkiny (d) do VDAC1 w izolowanych mitochondriach z hipokampa. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5 eksperymentów (n = 5). Zdjęcia reprezentatywne; K - kontrola, M - MIA.

Stan sieci i utrzymanie homeostazy mitochondrialnej są również w znacznym stopniu zależne od procesu biogenezy tych organelli. Zbadano wobec tego ekspresję kluczowych genów kodujących czynniki transkrypcyjne regulujące biogenezę mitochondrialną, PGC-1 α , Nrf-1 oraz TFAM. W korze mózgu młodych zwierząt potomnych z grupy MIA wykazano obniżoną ekspresję *Ppargc1* o 16%, *Nrf1* o 20% oraz *Tfam* o 27% (Rycina 51a), natomiast w hipokampie ekspresja *Tfam* spadała o 41%, chociaż ekspresja *Ppargc1* oraz *Nrf1* nie zmieniała się (Rycina 52a). Wykazano również obniżenie aktywności syntazy cytrynianowej o 37% w korze mózgu oraz o 63% w hipokampie, co wskazuje na spadek ilości mitochondriów (Rycina 51b i Rycina 52b).



Rycina 51. Analiza ekspresji białek związanych z biogenezą mitochondriów i aktywności syntazy cytrynianowej w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. a) Poziom ekspresji genów *Ppargc1*, *Nrf1* i *Tfam* w korze mózgu, normalizowano względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 4-5 eksperymentów (n = 4 - 5); b) Poziom aktywności syntazy cytrynianowej w korze mózgu. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 6-7 eksperymentów (n = 6 - 7); *p<0,05, **<0,01 w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

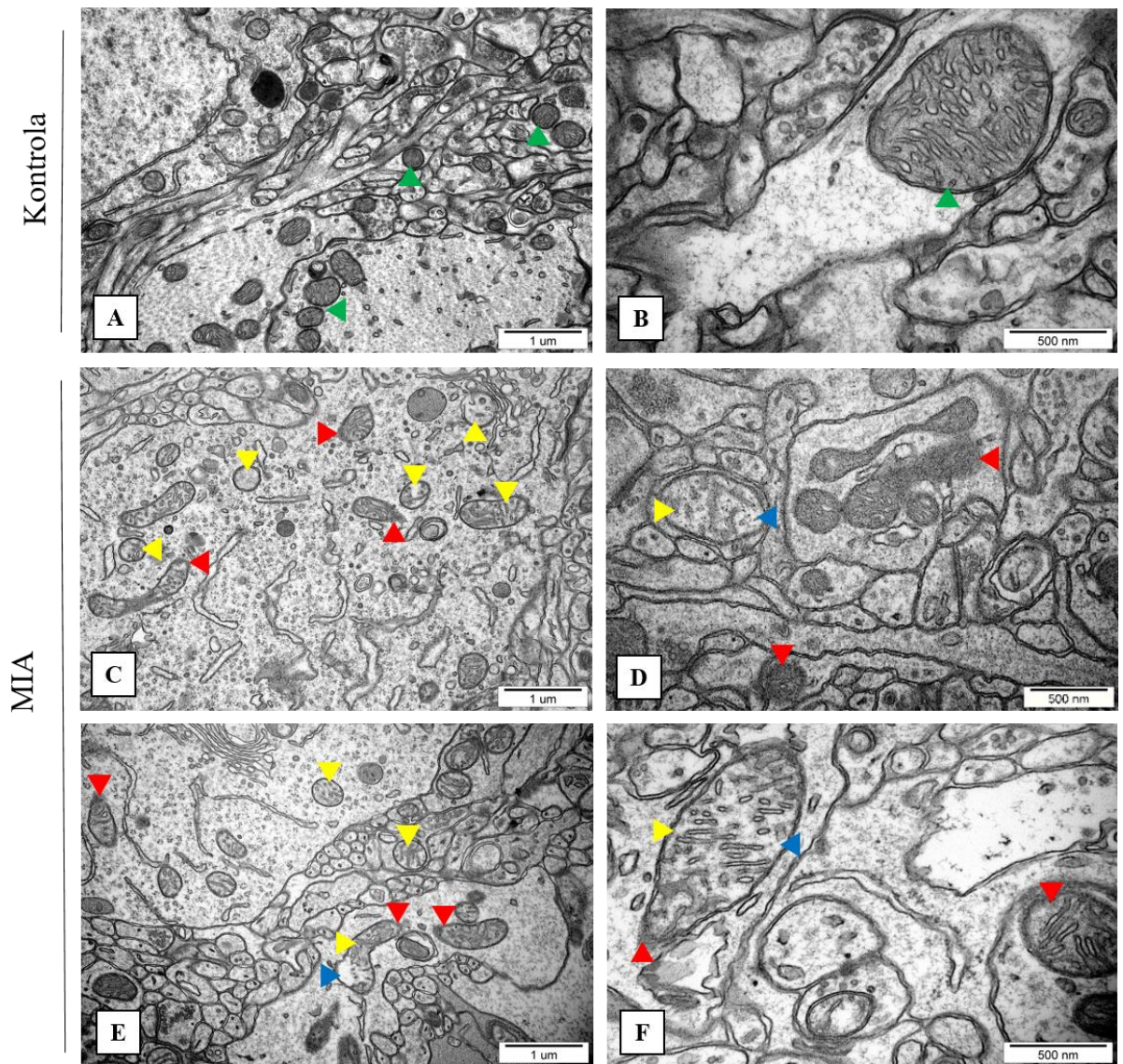


Rycina 52. Analiza ekspresji białek związanych z biogenezą mitochondriów i aktywności syntazy cytrynianowej w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. a) Poziom ekspresji genów *Pparg1*, *Nrfl* i *Tfam* w hipokampie, normalizowany względem genu kodującego β -aktynę (*Actb*). Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 4-5 eksperymentów ($n = 4 - 5$); b) Poziom aktywności syntazy cytrynianowej w hipokampie. Prezentowane dane to średnie \pm SEM pochodzące z 5-6 eksperymentów ($n = 5 - 6$); **$0,01$ w stosunku do kontroli; test *t*-Studenta.

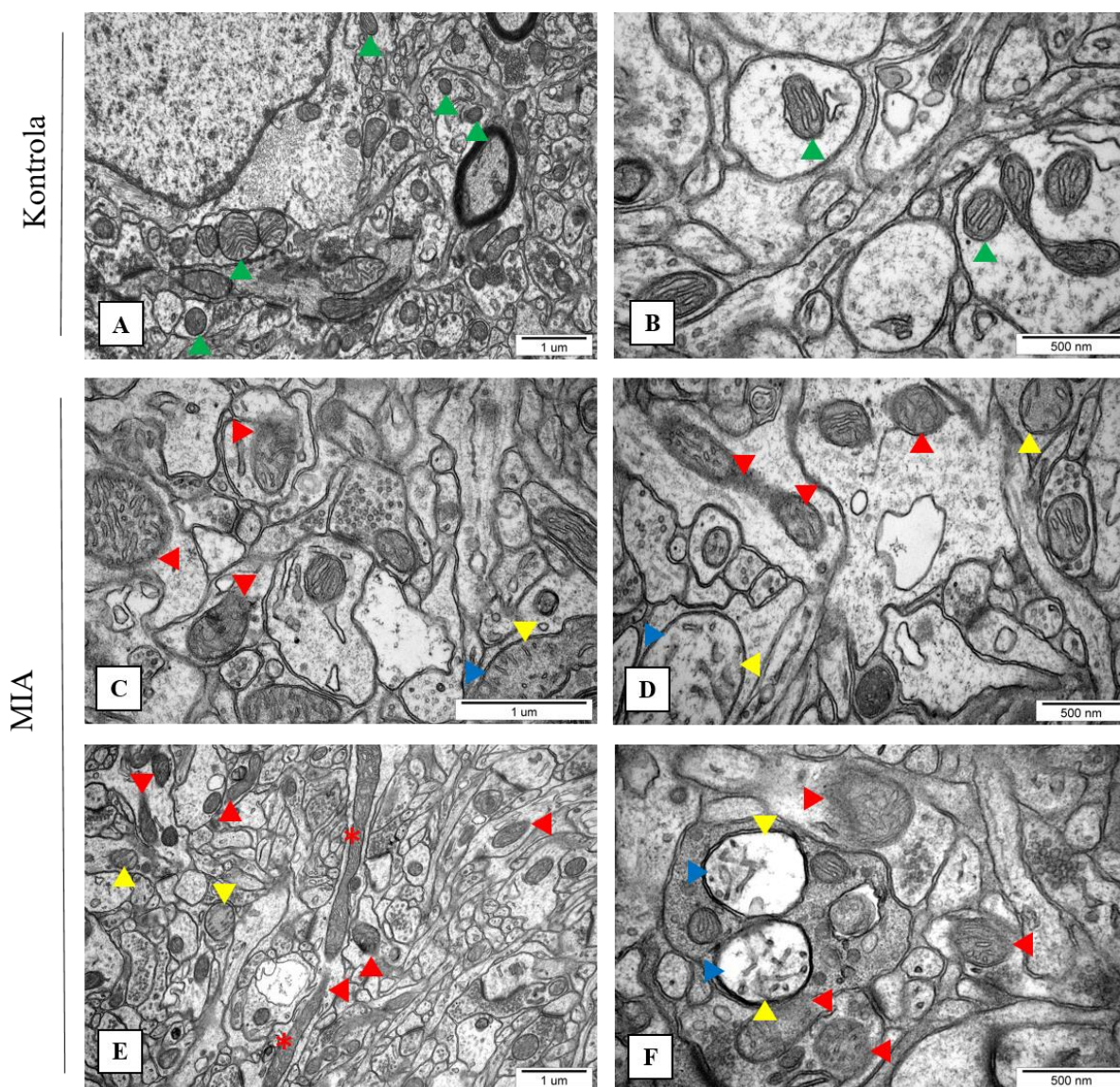
10.7.4. Zaburzenia ultrastruktury mitochondriów

Analiza z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego wykazała liczne zmiany ultrastrukturalne mitochondriów z grupy MIA w stosunku do mitochondriów kontrolnych zarówno w korze mózgu (Rycina 53) jak i w hipokampie (Rycina 54). Wśród mitochondriów z grupy MIA zaobserwowano organella o zatartej strukturze grzebieni oraz błony mitochondrialnej. Obserwowano również mitochondria charakteryzujące się przerwaniem ciągłości błony mitochondrialnej. Dodatkowo, w niektórych mitochondriach zaobserwowano ubytek grzebieni mitochondrialnych. Ponadto, część mitochondriów z grupy MIA posiadała jasną macierz mitochondrialną, co jest cechą charakterystyczną obrzęku mitochondriów. Podsumowując, prenatalne narażenie na działanie MIA skutkuje

negatywnymi zmianami w ultrastrukturze mitochondriów, mogącymi przekładać się na obserwowane zaburzenia funkcji tych organelli.



Rycina 53. Analiza ultrastruktury mitochondriów w korze mózgu młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Zdjęcia wykonane z pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego. **A-B** - Mitochondria kontrolne. Widoczna zachowana zewnątrz błona mitochondrialna i liczne grzebienie mitochondrialne (zielone strzałki). **C-F** – Mitochondria z grupy MIA. Obserwowano zatarcie struktury grzebieni i błony mitochondrialnej (czerwone strzałki, **C-F**). Obecne były mitochondria o jasnej macierzy, wykazujące cechy obrzęku (niebieskie strzałki, **D-F**), a także mitochondria wykazujące ubytek grzebieni (żółte strzałki, **C-F**).



Rycina 54. Analiza ultrastruktury mitochondriów w hipokampie młodych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA. Zdjęcia wykonane z pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego. **A-B** - Mitochondria kontrolne. Widoczna zewnątrz błona mitochondrialna i nienaruszone grzebienie mitochondrialne (zielone strzałki). **C-F** - Mitochondria z grupy MIA. Obserwowano zatarcie struktury grzebieni i błony mitochondrialnej (czerwone strzałki, **C-F**). Obecne były mitochondria o jasnej macierzy, wykazujące cechy obrzęku (niebieskie strzałki, **C,D,F**), a także mitochondria wykazujące ubytek grzebieni (żółte strzałki, **C-F**). Widoczne były również mitochondria o wydłużonym kształcie (czerwona *, **E**).

Podsumowując, uzyskane wyniki badań wykazały, iż aktywacja układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży powoduje znaczące zaburzenia struktury, funkcji i dynamiki mitochondriów w mózgu młodych zwierząt potomnych. Zmiany zależne są od struktury mózgu. W hipokampie zaburzenia są mniej spektakularne niż w korze mózgu, w której zaobserwowano obniżenie aktywności kompleksu I, III i IV łańcucha transportu elektronów, wzrost poziomu białek odpowiedzialnych za fragmentację oraz obniżenie ekspresji genów

regulujących biogenezę. Analiza aktywności syntazy cytrynianowej ujawniła, że w obu strukturach mózgu zmniejsza się ilość mitochondriów.

11. Dyskusja

Aktywacja układu odpornościowego matki (MIA) jest jednym z czynników ryzyka wystąpienia chorób neurorozwojowych u potomstwa, w tym chorób ze spektrum autyzmu, potwierdzonym zarówno w badaniach epidemiologicznych [Atladóttir *et al.*, 2010; Atladóttir *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2014] jak i doświadczeniami na zwierzętach [Meyer *et al.*, 2008; Giovanoli *et al.*, 2016; Fernández de Cossío *et al.*, 2017]. Różne badania na modelach zwierzęcych dostarczają danych o różnorodnych aspektach funkcjonowania OUN po prenatalnej ekspozycji na MIA, wykazując m.in. zaburzenia behawioralne [Lanté *et al.*, 2007; Malkova *et al.*, 2012; Arsenault *et al.*, 2014; Zhang & van Praag, 2015; Choi *et al.*, 2016; Kirsten & Bernardi, 2017; Murray *et al.*, 2017; Pendyala *et al.*, 2017; Shin Yim *et al.*, 2017], zmiany w gęstości neuronów [Shi *et al.*, 2009; Naviaux *et al.*, 2013; Duchatel *et al.*, 2016; Antonson *et al.*, 2018] i wypustek dendrytycznych [Zhang & van Praag, 2015; Fernández de Cossío *et al.*, 2017], nieprawidłowości w funkcjonowaniu synaps [Zhang & van Praag, 2015; Canetta *et al.*, 2016; Shin Yim *et al.*, 2017], zmiany w poziomie neurotransmiterów [Tang *et al.*, 2013a; Richetto *et al.*, 2015; Fujita *et al.*, 2016; Rahman *et al.*, 2017] czy zmiany poziomu cytokin [Garay *et al.*, 2013; Giovanoli *et al.*, 2016; Pendyala *et al.*, 2017]. Coraz częściej podkreśla się również udział neurozapalenia (ang. neuroinflammation) [Fan & Pang, 2017; Han *et al.*, 2021] oraz stresu oksydacyjnego [Bjørklund *et al.*, 2020; Curpan *et al.*, 2021] w patomechanizmie chorób neurorozwojowych [Oskvig *et al.*, 2012; Simões *et al.*, 2018; Talukdar *et al.*, 2020]. Mimo wyraźnego zainteresowania wpływem aktywacji układu odpornościowego matki na wczesnych etapach ciąży na rozwój mózgu potomstwa, do chwili obecnej nie istnieją badania, które wyjaśniałyby udział mitochondriów w zaburzeniach neurorozwojowych indukowanych MIA. Z kolei u pacjentów z ASD obserwuje się zaburzenia mitochondrialne [Frye, 2020], obejmujące zmiany w ekspresji, poziomie i aktywności kompleksów łańcucha transportu elektronów [Chauhan *et al.*, 2011; Anitha *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2013b] czy też zaburzenia transportu i dynamiki mitochondriów [Anitha *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013b]. Prowadzone badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej dysertacji korespondują z danymi literaturowymi i wskazują na poważne zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów u potomstwa po prenatalnej ekspozycji na MIA. Zmiany zależne są od struktury mózgu i etapu rozwoju potomstwa.

11.1. Zależne od pobudzenia układu odpornościowego matki zmiany w tkance płodowej.

Badania rozpoczęto od wywołania odpowiedzi układu odpornościowego matki poprzez dootrzewnowe podanie LPS (100 µg/kg m.c.) ciężarnej samicy szczurów stada Wistar w 9,5 dniu ciąży. Wybór momentu podania endotoksyny ciężarnym samicom był nieprzypadkowy, jako iż jest to okres szczególnej wrażliwości, w którym aktywacja układu odpornościowego matki może wpływać na rozwój OUN u płodu, prowadząc do dysfunkcji neuronalnych i skutków behawioralnych u potomstwa. W 9-11 dniu szczurzej ciąży rozpoczynają się podziały nerwowych komórek macierzystych, angiogeneza kory mózgu i migracja neuronów [Baines *et al.*, 2020]. Prenatalne infekcje w początkowych i środkowych etapach ciąży skutkują znacznie silniejszymi następstwami w rozwoju mózgu niż infekcje w końcowych jej etapach [Meyer *et al.*, 2007; Kirsten *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2021]. Co więcej, podanie LPS w 9,5 dniu szczurzej ciąży zostało potwierdzone w literaturze jako wywołujące zmiany behawioralne u potomstwa [Kirsten *et al.*, 2012; Kirsten *et al.*, 2013; Kirsten & Bernardi, 2017; de Camargo *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2021; da Rosa *et al.*, 2022; Carbone *et al.*, 2023].

Podanie zwierzętom endotoksyny bakteryjnej stymuluje OUN do aktywowania charakterystycznych objawów chorobowych określanych jako „*sickness behavior*” [Sah *et al.*, 2011]. Do tego typu objawów zalicza się gorączkę, choć dość często pojawia się anapireksja, czyli przejściowy stan obniżenia temperatury ciała, o właściwościach protekcyjnych [Liu *et al.*, 2012]. Poza tym obserwuje się zwiększoną senność, zmniejszone pobieranie jedzenia i picia, ograniczoną ruchliwość oraz zmniejszone zainteresowanie interakcjami społecznymi [Abareshi *et al.*, 2019]. Opisany zespół objawów ma na celu wzmocnienie działania układu immunologicznego, poprzez skupienie zasobów organizmu na walce z zakażeniem [Soszyński, 2004]. W istocie, u samic wykorzystywanych w niniejszej pracy zaobserwowano obniżenie pobierania wody oraz tendencję spadkową w pobieraniu pokarmu, przejściowe obniżenie temperatury ciała, a także zmniejszoną ruchliwość, półprzymknięcie oczu oraz zmniejszone reagowanie na bodźce, co wskazuje na rozwój odpowiedzi układu odpornościowego matki po iniekcji endotoksyny. Dotychczasowe dane wskazują iż LPS, podany matce dootrzewnowo jest wykrywalny w jamie ciała, w wątrobie, w nerkach, a także w łożysku do 8h po iniekcji. Toksyny nie stwierdzano natomiast w mózgu matki oraz w ciele płodu [Ashdown *et al.*, 2006]. Dlatego

uważa się, iż LPS nie ma zdolności do przekraczania bariery łożyska, choć może je uszkadzać i wpływać na rozwój lokalnego stanu zapalnego [Fricke *et al.*, 2018; Elgin *et al.*, 2019] oraz pośrednio, poprzez matczyne cytokiny, mające zdolność przechodzenia przez łożysko, może indukować stan zapalny w tkankach płodu [Kirsten *et al.*, 2013]. W istocie, wiele badań wskazuje na wzrost poziomu cytokin prozapalnych we krwi matki po podaniu LPS, między innymi IL-6, TNF- α [Ashdown *et al.*, 2006; Schaafsma *et al.*, 2017b], IL-17a [Wu *et al.*, 2018]. Ponadto, dotychczas prowadzone w ZKTS badania wykazały znaczący wzrost poziomu prozapalnej cytokiny TNF α we krwi szczurzych samic 3 godziny po podaniu LPS w dawce 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c., którą stosowano w niniejszej pracy [Dominiak *et al.*, 2017], co potwierdza aktywację układu odpornościowego w organizmie. By nie wywoływać dodatkowego stresu u ciężarnych samic, który mógłby wpłynąć na rozwój potomstwa, w tej pracy nie pobierano krwi w celu ponownego oznaczenia poziomu cytokin.

Dane literaturowe wskazują również na wzrost ekspresji *Il1b*, *Il6* i *Tnf* [Urakubo *et al.*, 2001; Gayle *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2021] w łożyskach do 24h od podania LPS. Uzyskane wyniki badań wykazały wyłącznie znaczący wzrost ekspresji *Il1b* w łożyskach, 24 godziny po podaniu endotyksyny, podczas gdy ekspresja *Il6* i *Tnf* pozostawały bez zmian. Podobne wyniki uzyskali Straley i wsp., którzy również zaobserwowali wzrost ekspresji *Il1b* i brak zmian w ekspresji *Tnf* [Straley *et al.*, 2014]. Z kolei Carpentier i wsp. zaobserwowali wzrost poziomu TNF α i IL-6 w łożyskach jedynie po 2h od podania LPS, bez zmian poziomu po 6 i 24h [Carpentier *et al.*, 2011]. Może to sugerować, iż podwyższona ekspresja tych cytokin w łożysku jest krótkotrwała i nie utrzymuje się przez dłuższy czas. Co ciekawe, Girard i wsp. wykazali, iż jednoczesne podanie LPS i antagonisty dla receptora IL-1, chroni łożyska przed uszkodzeniami i zmianami neurorozwojowymi u potomstwa [Girard *et al.*, 2010], co łącznie z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy wskazuje na duże znaczenie IL-1 β w rozwoju mózgu w warunkach MIA. Wiele badań wykazało wzrost poziomu cytokin prozapalnych również w mózgu płodów, w krótkim czasie po wywołaniu MIA. Obserwowano wzrost poziomu IL-1 β , IL-6 i TNF α 4h po podaniu poli(I:C) [Vuillermot *et al.*, 2017], a także podwyższony poziom IL-1 β , IL-6, TNF α i IFN- γ , oraz kilku innych cytokin (IL-2, IL-5, M-CSF, IL-4, IL-10, IL-18, IL-7, EPO i innych) 24h po podaniu LPS [Simões *et al.*, 2018]. Oskvig i wsp. zaobserwowali wzrost poziomu IL-1 β , IL-6 i TNF α 4h i 24h po iniekcji. Należy jednak wspomnieć, iż wzrostowi poziomu cytokin nie towarzyszył wzrost ekspresji odpowiednich genów, co sugeruje, iż cytokiny te nie pochodziły z mózgu płodu [Oskvig *et al.*, 2012].

Z drugiej strony w innych pracach obserwowano wzrost ekspresji *Il1b*, *Tnf* [Cai *et al.*, 2000; O'Loughlin *et al.*, 2017] oraz *Il6* po podaniu LPS [O'Loughlin *et al.*, 2017]. Dane uzyskane w niniejszej pracy korespondują z danymi literaturowymi, jako iż zaobserwowano wzrost ekspresji *Il1b*, *Il6*, *Ifng* oraz *Tnf* w tkankach płodowych 24h po wywołaniu MIA. Sugeruje to, iż MIA wywołuje rozwój procesów prozapalnych w tkankach płodowych, co dodatkowo potwierdza zaobserwowany wzrost poziomu białka *Iba1*, będącego markerem makrofagów oraz mikrogleju. Wpływ MIA na płodowy mikroglej został udokumentowany w literaturze. Loayza i wsp. zaobserwowali, że podanie LPS indukowało aktywację mikrogleju, zarówno w kierunku M1 jak i M2, oraz zwiększało ekspresję cytokin o plejotropowym działaniu. [Loayza *et al.*, 2022]. Obserwowano również zwiększenie ilości komórek mikrogleju (*Iba1*⁺) oraz aktywnego mikrogleju (*Iba1*⁺/*CD68*⁺) po podaniu poli(I:C) [Wu *et al.*, 2018]. Aktywacja formującego się układu immunologicznego oraz podwyższony poziom cytokin prozapalnych na tym etapie życia może mieć kluczowy wpływ na dalszy rozwój. W warunkach fizjologicznych cytokiny biorą czynny udział w dojrzewaniu układu nerwowego [Mousa & Bakhiet, 2013] przyczyniając się do proliferacji nerwowych komórek macierzystych, odgrywając rolę w formowaniu i przycinaniu synaps przez komórki mikrogleju (ang. synaptic pruning) [Stellwagen & Malenka, 2006], oraz różnicowaniu i migracji komórek układu nerwowego [Hegazy *et al.*, 2015]. Jednocześnie, wykazano negatywny wpływ nadmiernego poziomu cytokin prozapalnych w okresie prenatalnym na neurorozwój potomstwa [Samuelsson *et al.*, 2006; Crampton *et al.*, 2012; Chudnovets *et al.*, 2020].

Jednym z czynników powiązanych z aktywacją układu immunologicznego i stanem zapalnym, szczególnie w OUN, jest stres oksydacyjny, wynikający z zaburzenia równowagi pomiędzy tempem powstawania RFT a wydolnością układu antyoksydacyjnego. RFT mogą być produkowane jako część odpowiedzi immunologicznej [Andreyev *et al.*, 2020], jednocześnie wysoki poziom RFT może stymulować i pogłębiać stan zapalny [Chatterjee, 2016]. Uważa się więc, iż te zjawiska stymulują się wzajemnie [Biswas, 2016]. Faktycznie, w niniejszych badaniach wykazano, że w tkance płodowej 24h po indukcji MIA dochodzi do wzrostu poziomu RFT, szczególnie generowany jest $O_2^{\cdot-}$. Obecność markerów stresu oksydacyjnego w wykorzystywanym w niniejszej pracy modelu koresponduje z wynikami literaturowymi. W innych pracach, w mózgach płodów po prenatalnej ekspozycji na MIA obserwowano podwyższone stężenie dialdehydu malonowego (ang. malondialdehyde, MDA), głównego produktu peroksydacji lipidów oraz podwyższony poziom karbonylacji

białek, efektu reakcji RFT z łańcuchami bocznymi aminokwasów [Simões *et al.*, 2018], co wskazuje na obecność stresu oksydacyjnego.

Za najważniejsze źródło RFT w komórce uważane są mitochondria, a dokładniej mitochondrialny łańcuch oddechowy, jednak istotnym producentem RFT są również enzymy z rodziny oksydaz NADPH (NOX). Enzymy te produkują $O_2^{\cdot-}$ lub H_2O_2 (w zależności od izoformy) i są obecne zarówno w komórkach układu odpornościowego (np. NOX2 w neutrofilach i makrofagach, gdzie bierze udział w wybuchu tlenowym) jak i w innych komórkach organizmu gdzie biorą udział przede wszystkim w komunikacji wewnątrz- i międzykomórkowej [Przybylska & Mosieniak, 2014; Sarniak *et al.*, 2016]. Niewielkie ilości RFT produkowanych przez NOX są niezbędne dla prawidłowego rozwoju OUN, a w warunkach fizjologicznych NOX wpływają stymulująco na neurogenezę, proliferację i różnicowanie nerwowych komórek macierzystych [Terzi & Suter, 2020], jednak nadmierna aktywność NOX i zależny od tego enzymu wzrost $O_2^{\cdot-}$ generuje stres oksydacyjny i uszkodzenia lipidów, białek i DNA w OUN [Gao *et al.*, 2012]. Najnowsze badania wykazały wzrost ekspresji *Nox1* w mózгах płodów 48h po ekspozycji na MIA wywołanego poli(I:C). Co więcej, inaktywacja genu *Nox1* cofała zmiany behawioralne u 8-12 tygodniowych zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA [Zhang *et al.*, 2021]. W niniejszej pracy nie zaobserwowano zmian w ekspresji *Nox1*, wykazano natomiast wzrost ekspresji *Cybb* (NOX2) czemu towarzyszyła podwyższona aktywność NOX. Wzrost ekspresji *Cybb* do pewnego stopnia koresponduje z wynikami uzyskanymi w badaniach z udziałem osób z ASD, jako iż podwyższona ekspresja NOX2 obserwowana była w obwodowych komórkach T [Nadeem *et al.*, 2017] oraz w neutrofilach [Nadeem *et al.*, 2019] z krwi pacjentów z ASD. Należy jednak nadmienić, że nie ma pewności iż obserwowana w niniejszej pracy podwyższona aktywność NOX dotyczy wyłącznie NOX2, ponieważ mierzono ogólną aktywność oksydaz NADPH. Warto również wspomnieć, że w badaniach na myszach, u których MIA wywoływano poprzez podanie LPS, wykazano iż jednoczesne podawanie inhibitora dla NOX (apocyniny) od dnia indukcji MIA aż do porodu zapobiegało części zmian obserwowanych u potomstwa w grupie MIA - zarówno zmian w mózgu, związanych ze zwiększoną ilością mikrogleju obserwowaną w przodomózgowiu zwierząt z grupy MIA, jak i zmian w behawiorze, tj. złagodzenie obserwowanych w grupie MIA zachowań stereotypowych (nadmierne czyszczenie się) u 20-dniowych zwierząt [Le Belle *et al.*, 2014]. Wzrost aktywności NOX na tym etapie rozwoju wydaje się być zatem istotnym elementem w rozwoju zaburzeń autystycznych u potomstwa MIA, może być też

obiecującym punktem zaczepienia dla potencjalnych interwencji terapeutycznych. Zależny od NOX wzrost $O_2^{\cdot-}$ może prowadzić do obniżenia potencjału błonowego mitochondriów i uszkodzenia funkcji tych organelli [Lee & Jose, 2021]. Faktycznie, w niniejszej pracy zaobserwowano spadek $\Delta\Psi_m$ oraz poziomu ATP w tkance płodowej w grupie MIA, co może być konsekwencją tzw. wybuchu tlenowego, aktywacji zlokalizowanej w komórkach układu odpornościowego NOX2 i wzrostu zależnej od NOX produkcji $O_2^{\cdot-}$. Obserwowane zmiany wskazują, iż MIA wpływa na funkcjonowanie mitochondriów już na tak wczesnym etapie rozwoju. Zaburzenia mitochondriów na etapie prenatalnym mogą mieć znaczny wpływ na funkcjonowanie OUN w późniejszym życiu. Mitochondria wpływają na losy neuronalnych komórek macierzystych (ang. neural stem cells, NSC), regulując ich przejście z proliferacji do różnicowania [Facucho-Oliveira *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010]. Białka związane z dynamiką mitochondriów biorą czynny udział w powstawaniu neurosfer [Khacho *et al.*, 2016], są również niezbędne, by mogła zajść migracja neuronów [Lindhendel *et al.*, 2016]. Mitochondria biorą udział w dojrzewaniu astrocytów i formowaniu synaps [Zehnder *et al.*, 2021], wpływają na proces rozgałęziania aksonów [Smith & Gallo, 2018] i na utrzymywanie bariery krew-mózg [Doll *et al.*, 2015a]. To wszystko, w połączeniu z ogromnym zapotrzebowaniem mózgu na energię (ludzki mózg, stanowiący ok. 2% całkowitej masy ciała, zużywa ok. 20% całej pozyskiwanej przez organizm energii [Raichle, 2010]), wiąże mitochondria zarówno z prawidłowym funkcjonowaniem OUN, jak również powoduje, że nawet niewielkie zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów mogą predysponować do rozwoju zaburzeń neurorozwojowych.

11.2. Zmiany behawioralne u potomstwa MIA na różnych etapach życia

W niniejszej pracy przeprowadzono analizę społecznych zachowań szczurów w celu scharakteryzowania zachowań ASD-podobnych. W celu sprawdzenia potencjalnych zaburzeń komunikacji oceniano wokalizację ultradźwiękową (USV) osesków izolowanych od matki i rodzeństwa. Poziom towarzyskości i zachowania społeczne badano z wykorzystaniem trójkomorowego testu socjalizacji. Zaburzenia motoryczne i zachowania lękowe analizowano z pomocą testu otwartego pola. Dodatkowo zbadano zachowania związane z poszukiwaniem gniazda na podstawie zapachu z pomocą testu preferencji ściółki.

Pacjenci z ASD w większości przypadków mają trudności z komunikacją i porozumiewaniem się. Zaburzenia komunikacji są jednak bardzo zróżnicowane. Od całkowitego braku umiejętności porozumiewania się, poprzez umiejętność mówienia pełnymi zdaniami, aż po kompulsywne powtarzanie pytań, całych zdań, często z elementami echolalii (częste powtarzanie wybranych słów) i stereotypii językowych. Głównym sposobem komunikacji u gryzoni jest emisja USV, niesłyszalnych dla ucha ludzkiego. Szczury emitują USV przez całe życie, zarówno w odpowiedzi na bodźce pozytywne jak i negatywne [Boulanger-Bertolus & Mouly, 2021]. USV mogą mieć różną wysokość w zależności od kontekstu, w którym są emitowane. 40-kHz USV emitowane są przez izolowane oseski w celu doprowadzenia do powrotu matki i przeniesienia przez nią młodych do gniazda. 50-kHz USV emitowane są przez samce zainteresowane samiczkami, a 22-kHz USV wiążą się z sytuacjami niebezpiecznymi, jak obecność drapieżnika, walka między samcami lub odczuwanie bólu [Takahashi *et al.*, 2010]. Badania nad USV po izolacji od matki w szczurzym modelu MIA indukowanym LPS nie są powszechne, a te istniejące są rozbieżne. W niektórych przypadkach zaobserwowano zmniejszenie liczby wokalizacji w stosunku do kontroli [Baharnoori *et al.*, 2012; Carbone *et al.*, 2023], a w innych brak różnic w liczbie wokalizacji [Kirsten *et al.*, 2015]. W niniejszej pracy wykazano wahania liczby wokalizacji w zależności od dnia eksperymentu. W pierwszym dniu eksperymentu (9 dzień życia) nie zaobserwowano różnic w stosunku do kontroli. W drugim dniu (10 dzień życia) zaobserwowano spadek wokalizacji w grupie MIA, natomiast w trzecim dniu eksperymentu (11 dzień życia) zaobserwowano niejednorodne wokalizowanie przez oseski z grupy MIA. W tym dniu można zaobserwować wyodrębnienie się dwóch grup osesków, tej która wokalizuje mniej w stosunku do kontroli, oraz takiej wokalizującej podobnie do kontroli lub bardziej intensywnie niż kontrole. Wydaje się, że aktywacja układu odpornościowego matki na wczesnym etapie ciąży prowadzi do ASD-podobnych zaburzeń komunikacji. Zmniejszoną liczbę wokalizacji uważa się za zaburzenie komunikacji społecznej, podczas gdy podwyższoną ilość USV można powiązać ze zwiększonym lękiem zwierząt [Brudzynski, 2021]. Niejednorodność zachowań osesków wykazana w tym eksperymencie współgra z faktem iż ASD jest zaburzeniem o wyjątkowo szerokim spektrum, dającym różnorakie objawy. Należy pamiętać, że każde dziecko z autyzmem jest inne i wymaga indywidualnej terapii dobranej do typu zaburzeń.

Kolejnym testem przeprowadzonym z udziałem osesków (15 dzień życia) był test preferencji ściółki. Test ten wykorzystuje instynktowne poszukiwanie przez szczurze oseski

bliskości matki i rodzeństwa, oraz rozróżniania znajomego „domowego” zapachu od zapachów neutralnych, co jest wczesną oznaką odróżniania społecznego (ang. social discrimination) [Carbone *et al.*, 2023]. Zdolność do rozpoznawania zapachu matki (i gniazda) jest niezbędna dla przetrwania i rozwoju młodych. W normalnych warunkach młode szybko uczą się rozpoznawać zapach gniazda, co stymuluje zbliżanie się do niego oraz preferowanie go w obecności innych zapachów [de Souza *et al.*, 2012]. Zgodnie z oczekiwaniami, kontrole spędzały więcej czasu w części klatki wypełnionej ściółką o zapachu „domu”, szukając w ten sposób instynktownie matki i rodzeństwa. Natomiast zwierzęta z grupy MIA spędzały podobny zakres czasu w obu częściach klatki. Badania wskazują na zaburzenie wczesnych zachowań społecznych, co koresponduje z wynikami innych badaczy. Niewielkie zainteresowanie zapachem gniazda i brak szukania rodziny wykazano u zwierząt MIA po indukcji LPS w innych pracach [Kirsten *et al.*, 2011; Baharnoori *et al.*, 2012], choć nie wszyscy zaobserwowali taki efekt [Carbone *et al.*, 2023].

Do najbardziej typowych zaburzeń behawioralnych obserwowanych w ASD należą zaburzenia towarzyskości i zachowań społecznych. Rodzice dzieci z ASD jako pierwsze niepokojące objawy zauważają opóźnienie mowy, brak kontaktu wzrokowego oraz brak reakcji na własne imię. Do innych objawów zaburzeń zachowań społecznych należą ograniczone zdolności naśladowania, ignorowanie innych osób, słabe reagowanie na ich obecność, brak zainteresowania zabawą społeczną i preferowanie samotności, niechęć do kontaktu fizycznego, brak uśmiechu społecznego, uboga mimika [Winczura, 2019]. Oczywistym jest, iż nie wszystkie z wymienionych zachowań można ocenić w modelach zwierzęcych. Szczury charakteryzują się jednak wyraźnymi zachowaniami społecznymi, a zanik lub obniżenie intensywności tego typu zachowań może być traktowane jako tożsame z objawami zaburzeń występujących u ludzi. Testem pozwalającym na badanie zachowań społecznych, szczególnie interakcji z innymi osobnikami tego samego gatunku jest trójkomorowy test socjalizacji. W tym teście zwierzę ma swobodny dostęp do wszystkich części klatki, co oznacza iż inicjacja kontaktu z wizytatorami (obcymi osobnikami zamkniętymi w mniejszych, wewnętrznych klatkach) leży całkowicie po stronie zwierzęcia biorącego udział w eksperymencie. Test ten bada w istocie dwa parametry, towarzyskość (ang. sociability) oraz zainteresowanie nowością społeczną (ang. preference for social novelty). Faza pierwsza pozwala zwierzęciu na adaptację do nowego środowiska. Faza druga bada chęć zwierzęcia biorącego udział w eksperymencie do socjalizacji z nieznanym mu osobnikiem (towarzyskość), a faza trzecia bada preferencję socjalną, gdzie zwierzę badane

ma wybór między przebywaniem w towarzystwie poznanego wcześniej osobnika, lub nowego osobnika wprowadzonego do eksperymentu (zainteresowanie nowością społeczną). Zdrowy, prawidłowo funkcjonujący szczur preferuje spędzanie czasu z drugim osobnikiem, a także bardziej interesuje się nowymi osobnikami niż tymi, które już zna. W niniejszej pracy zaobserwowano zaburzenia zachowań społecznych u szczurów prenatalnie narażonych na działanie MIA. Choć zarówno kontrole jak i szczury z grupy MIA preferowały klatkę z wizytatorem od pustej klatki, szczury MIA spędzały znacznie mniej czasu z drugim szczurem niż zwierzęta kontrolne, co wskazuje na zmniejszoną towarzyskość badanych zwierząt. Ponadto, szczury z grupy MIA spędzały podobną ilość czasu z nowym szczurem co ze zwierzęciem wcześniej poznanym, a więcej w środkowej komorze niż szczury z grupy kontrolnej, co wskazuje na zmniejszone zainteresowanie nowością społeczną. Podobne deficyty w zachowaniach społecznych obserwowane były w innych pracach. Carbone i wsp. zaobserwowali obniżenie towarzyskości szczurów prenatalnie poddanych działaniu MIA, zarówno w 35 jak i 75 dniu życia [Carbone *et al.*, 2023]. Również Oskvig i wsp. badali zachowania społeczne z pomocą testu trójkomorowego co 5 dni, od 25 do 55 dnia życia i również wykazali deficyty w zachowaniach społecznych zwierząt z grupy MIA we wszystkich punktach czasowych [Oskvig *et al.*, 2012].

Wśród rzadziej występujących zaburzeń behawioralnych dotyczących osoby z ASD wymienia się zaburzenia motoryczne [McPhillips *et al.*, 2014]. Choć nie występują one we wszystkich przypadkach, stwierdzono iż dzieci z ASD mają częściej problemy z motoryką dużą (równowagą, koordynacją ruchów, kontrolą szybkości i siły) niż rówieśnicy [Sroka, 2012]. Z drugiej strony, u dzieci z autyzmem często występuje nadpobudliwość psychoruchowa [Leyfer *et al.*, 2006]. Innym objawem często towarzyszącym ASD są zaburzenia lękowe, około 50% dorosłych i dzieci z ASD jest dodatkowo diagnozowanych z zaburzeniami lękowymi [Rodgers & Ofield, 2018]. W modelach zwierzęcych testem pozwalającym na wykrycie deficytów motorycznych czy zwiększonej lęklivosti (związanej ze zmniejszoną aktywnością eksploracyjną) jest test otwartego pola. Test ten pozwala ocenić przemierzony w nieznanym środowisku dystans oraz szybkość poruszania się, pozwala również określić zainteresowanie eksploracją zarówno strefy peryferyjnej (pod ściankami boksu) jak i strefy centralnej. Wyjście na otwartą przestrzeń wiąże się z wystawieniem się na niebezpieczeństwo, będzie więc unikane przez zwierzęta o większym poziomie lęku [Lipkind *et al.*, 2004]. W niniejszej pracy nie zaobserwowano zaburzeń motorycznych czy zwiększonej lęklivosti u zwierząt z grupy MIA, jako iż nie

wykazywały one zmniejszonej aktywności i eksploracji w stosunku do zwierząt kontrolnych. Koresponduje to do pewnego stopnia z danymi literaturowymi, w których nie zaobserwowano zaburzeń motorycznych u zwierząt w takich samych jak w niniejszej pracy warunkach doświadczalnych (LPS podawany w 9,5 dniu ciąży w dawce 100µg/kg) [Kirsten *et al.*, 2010]. W innym badaniu nie zaobserwowano zmian, gdy LPS podawano w 12 dniu ciąży, natomiast zmiany pojawiły się u zwierząt prenatalnie poddanych działaniu MIA w 16 dniu ciąży [Straley *et al.*, 2017]. Zaburzenia lękowe zaobserwowano też u zwierząt, których matkom podawano LPS w 12 dniu ciąży, ale w większej dawce (1,5 mg/kg) [Talukdar *et al.*, 2020]. Sugeruje to, iż wystąpienie niektórych objawów behawioralnych w wykorzystywanym modelu zależne jest od dawki endotoksyny oraz etapu rozwoju płodu.

11.3. Zaburzenia molekularne w mózgu osesków narażonych na działanie MIA

Pierwszych 7-10 dni po urodzeniu szczura to okres kluczowy w neurorozwoju i odpowiada okresowi okołoporodowemu u człowieka (36-40 tydzień ciąży oraz okres tuż po urodzeniu) [Zeiss, 2021] Dochodzi wówczas do intensywnego wzrostu mózgu [Bockhorst *et al.*, 2008], zwiększenia gęstości aksonów i dendrytów [Semple *et al.*, 2013], intensywnej gliogenezy [Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009], dojrzewania oligodendrocytów i mielinizacji [Dean *et al.*, 2011] oraz dojrzewania układu odpornościowego [Holsapple *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2015]. Koniec okresu prenatalnego i wczesny okres postnatalny wiążą się również z intensywną synaptogenezą, a stan zapalny w tym okresie powiązany z zaburzeniami struktury i funkcji synaps [Mottahedin *et al.*, 2017].

Aktywacja procesów prozapalnych oraz stres oksydacyjny w tym okresie życia może być wyjątkowo niebezpieczny dla rozwijającego się mózgu. Zaobserwowano, iż dzieci u których później zdiagnozowano ASD, miały po urodzeniu (do 72 godzin od porodu) podwyższony poziom IL-6 oraz IL-8 we krwi w porównaniu do dzieci z ogólnej populacji [Heuer *et al.*, 2019]. W innym badaniu zaobserwowano relację między późniejszą diagnozą ASD a wysokim poziomem IL-1 β i IL-4 tuż po urodzeniu. W niniejszej pracy zaobserwowano wzrost ekspresji *Il1b* i *Ifng* w mózgu osesków z grupy MIA w stosunku do kontroli, podczas gdy poziom ekspresji *Il6* oraz *Tnf* nie zmieniał się. O'Loughlin i wsp. również zaobserwowali wzrost ekspresji *Il1b* w mózgu 7-dniowych osesków po prenatalnej

indukcji MIA, i brak zmian w poziomie *Il6*, *Tnf* i *Il10* [O'Loughlin *et al.*, 2017]. Podobnie, inne grupy badawcze nie wykazały zmian w ekspresji *Tnf* w mózgu osesków po prenatalnej indukcji MIA, a wręcz wykazywano obniżoną ekspresję tej cytokiny [Gilmore *et al.*, 2005; Arsenault *et al.*, 2014]. Badania własne oraz te z literatury wskazują, że na tak wczesnym etapie rozwoju kluczową rolę w aktywacji procesów prozapalnych może pełnić IL-1 β oraz IFN- γ . Cytokiny prozapalne mogą prowadzić do aktywacji oksydazy NADPH [Brandes *et al.*, 2010]. Jak wcześniej wspomniano, enzym ten jest odpowiedzialny za zjawisko zwane „wybuchem tlenowym” fagocytów i jest aktywowany w odpowiedzi na infekcje bakteryjne i wirusowe w celu obrony organizmu przed patogenami. Faktycznie, w mózgu 7-dniowych osesków z grupy MIA zaobserwowano znaczący wzrost aktywności oksydazy NADPH oraz podwyższony poziom RFT. W wyniku działania LPS, dochodzi bardzo często do aktywacji syntazy tlenu azotu (NOS) i wzrostu poziomu NO. Jednak wobec braku zmian w immunoreaktywności nitrotyrozyny, sugeruje się, że reaktywne formy azotu nie są bezpośrednio zaangażowane w aktywację stresu oksydacyjnego na tym etapie rozwoju mózgu zwierząt z grupy MIA. Rozwijający się mózg jest szczególnie wrażliwy na uszkodzenia powodowane przez RFT, z powodu dużej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych, wysokiego zapotrzebowania na tlen oraz dużą ilość wrażliwych, niedojrzałych komórek [Ikonomidou & Kaindl, 2011]. Dodatkowo, system antyoksydacyjny w mózgu noworodków jest niedojrzały, a zawartość antyoksydantów niższa niż na dalszych etapach życia [Shim & Kim, 2013; Perrone *et al.*, 2019]. Jednak zaobserwowany wzrost poziomu Nrf2, jednego z najważniejszych białek w systemie antyoksydacyjnym, oraz niewielki wzrost ekspresji *Gpx1* i *Cat*, wskazuje na uruchomienie mechanizmów obrony antyoksydacyjnej w odpowiedzi na wzrost poziomu RFT. Nie wykazano jednak zmian w ekspresji *Sod1* i *Sod2*, zatem wydaje się, że aktywacja systemu antyoksydacyjnego w grupie MIA może być niewystarczająca dla zniwelowania stresu oksydacyjnego.

Mitochondria są wrażliwe na wysoki poziom RFT, a jednocześnie są jednym z głównych producentów wolnych rodników w komórce. Podobnie jak w przypadku tkanki płodowej, również u 7-dniowych osesków zaobserwowano spadek $\Delta\Psi_m$ oraz poziomu ATP. Zarówno $\Delta\Psi_m$ jak i poziom ATP są bezpośrednio związane z funkcjonowaniem łańcucha transportu elektronów, a nieprawidłowości w działaniu łańcucha mogą przekładać się na obserwowane zmiany. Co zaskakujące, nie zaobserwowano jednak zmian w ekspresji ani w aktywności kompleksów mitochondrialnych, za wyjątkiem wzrostu ekspresji

podjednostki kompleksu II. Zatem sugeruje się, iż spadek $\Delta\Psi_m$ nie jest spowodowany zaburzeniami w aktywności kompleksów mitochondrialnych. Być może istotną rolę odgrywa tu rozprężenie łańcucha oddechowego. Uważa się, iż $O_2^{\cdot-}$ i peroksydacja lipidów prowadzą do aktywacji białek rozprzegających (ang. uncoupling proteins, UCP) [Cadenas, 2018; Monteiro *et al.*, 2021; Čater & Križančić Bombek, 2022]. Rozprężenie łańcucha powiązane z działaniem protekcyjnym, zapobiegającym nadmiernej produkcji RFT w mitochondriach [Zhao *et al.*, 2019]. Zaobserwowany w tej pracy brak zmian w funkcjonowaniu kompleksów łańcucha oddechowego może sugerować, iż łańcuch jest w istocie rozprężony i że jest to mechanizm protekcyjny, chroniący mitochondria przed uszkodzeniem, a całą komórkę przed stresem oksydacyjnym. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga jednak dalszych długotrwałych badań.

Zmiany potencjału błonowego istotnie wpływają na dynamikę mitochondriów. Wykazano, iż utrata potencjału wiąże się z zablokowaniem fuzji wewnętrznej błony mitochondrialnej [Oliveira, 2012]. Dodatkowo, procesy fuzji i fragmentacji są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania neuronów, nie tylko w dojrzałych komórkach, ale również w trakcie neurogenezy i różnicowania komórek macierzystych [Khacho & Slack, 2018]. Mimo iż zaobserwowano wzrost ekspresji genów zarówno dla białek związanych z fuzją (*Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1*) jak i fragmentacją (*Fis1*, *Drp1*), wzrost ten nie miał jednak odzwierciedlenia w poziomie białek. Co więcej, nie zaobserwowano zmiany w stosunku S-Opa1/L-Opa1, ani pDrp1/Drp1, co świadczy o braku inicjacji procesu fragmentacji. Wydaje się, iż wzrost ekspresji genów związanych z dynamiką może być mechanizmem kompensacyjnym. Zmiany w ekspresji genów nie zawsze korelują ze zmianą ilości białka [Liu *et al.*, 2016], a jednocześnie nie należy zapominać o istotnym wpływie modyfikacji potranskrypcyjnych, takich jak splicing, edycja czy metylacja mRNA, na końcowy efekt ekspresji genów [Brion *et al.*, 2020; Chavali *et al.*, 2020]. W związku z tym należy przyjąć iż dynamika mitochondriów nie zmienia się u 7-dniowych osesków z grupy MIA. Podobnie w przypadku biogenezy, choć zaobserwowano wzrost ekspresji genów *Pparg1*, *Nrf1* i *Tfam*, nie zmienił się poziom syntazy cytrynianowej, markera ilości mitochondriów [Larsen *et al.*, 2012], sugerując brak zmian w ilości tych organelli. W końcu zbadano poziom białek związanych z mitofagią, w tym przypadku również nie wykazano zmian. Brak aktywacji procesu mitofagii w obliczu spadku potencjału błonowego jest dość zaskakujący. Może to oznaczać, iż w całkowitej puli mitochondriów zaczyna się zwiększać odsetek organelli o obniżonym potencjale mitochondrialnym, które nie są usuwane.

Podsumowując, wydaje się, iż w mózgu 7-dniowych osesków z grupy MIA nie dochodzi do drastycznych zaburzeń parametrów mitochondrialnych, a źródłem RFT jest oksydaza NADPH.

11.4. Patologiczne zmiany w mózgu młodego potomstwa po prenatalnej ekspozycji na MIA

Do badań nad długofalowym wpływem MIA na mózg potomstwa wybrano 52-54 dzień życia zwierząt potomnych. Szczury w momencie ukończenia 50 dnia życia nie są jeszcze w pełni dojrzałe i nadal rosną, zwierzęta tego gatunku osiągają całkowitą dojrzałość szkieletową w wieku 210 dni (u ludzi ok. 20 rok życia). Jednak właśnie w okolicy 50 dnia życia u szczura następuje osiągnięcie dojrzałości płciowej (u ludzi średnio około 12 roku życia) [Agoston, 2017]. Można więc ten moment określić jako początek szczurzego „okresu dojrzewania”. Okres ten, zarówno u ludzi jak i u szczurów, wiąże się z intensywnymi zmianami w OUN, obejmującymi m.in. eliminację połączeń neuronalnych, czyli tzw. przycinanie synaptyczne, co jest kluczowym procesem w funkcjonalnym tworzeniu połączeń w mózgu oraz mielinizację, której zaburzenia prowadzą do nieprawidłowości w sygnalizacji neuronalnej [Schneider, 2013]. Co więcej, zarówno u ludzi jak i u szczurów jest to okres związany z występowaniem charakterystycznych zachowań, takich jak zwiększenie zainteresowania interakcjami z rówieśnikami obydwu płci, poszukiwanie nowości (ang. novelty-seeking) oraz podejmowanie ryzyka [Spear, 2000]. Uważa się również, iż okres ten, charakteryzujący się dużą plastycznością mózgu, jest jednocześnie czasem zwiększonej podatności na czynniki stresowe [Jankord *et al.*, 2011].

Badania prowadzono na korze mózgu oraz hipokampie. Kora mózgu jest u ludzi strukturą odpowiedzialną za wyższe funkcje poznawcze, takie jak język, myślenie, postrzeganie, pamięć epizodyczną, podejmowanie decyzji oraz planowanie motoryczne [Molnár *et al.*, 2019]. Na poziomie komórkowym, kora mózgu składa się z około 16 miliardów neuronów i stanowi ponad 80% całej masy mózgu [Cadwell *et al.*, 2019]. Zaburzenia rozwojowe tej struktury mózgu powiązano z kilkoma zaburzeniami neuropsychiatrycznymi, w tym z ASD [Juric-Sekhar & Hevner, 2019]. Część charakterystycznych dla ASD objawów behawioralnych wiąże się z nieprawidłowościami w funkcjonowaniu różnych obszarów kory mózgu, i tak zmiany w obrębie kory oczodołowo-czołowej wpływają na emocje, osobowość, a przede wszystkim zachowania

społeczne. Podobnie nieprawidłowości rozwojowe kory zakrętu obręczy, wiążą się z deficytami społeczno-poznawczymi, takimi jak brak wspólnej uwagi czy problemy w zakresie interakcji społecznych. Tylną korę ciemieniową również powiązano z deficytami w zakresie interakcji społecznych [Jach-Salamon, 2022]. Choć kora mózgu naczelnych i szczura różnią się budową, ilością połączeń, a także niektórymi funkcjami [Schaeffer *et al.*, 2020], to zarówno u ludzi jak i u szczurów ta struktura mózgu odpowiada za kontrolę zachowań społecznych [Kolb & Gibb, 2015]. Z kolei hipokamp to niewielka struktura mózgu tradycyjnie wiązana z pamięcią, budowaniem wspomnień oraz przyswajaniem wiedzy, ale również orientacją przestrzenną i wyobraźnią [Comrie *et al.*, 2022]. Odpowiada również za poznanie społeczne (ang. social cognition) a także przetwarzanie emocji [Zhu *et al.*, 2019]. Są to obszary funkcjonowania zaburzone w ASD. Wiele jest doniesień dotyczących obserwowanych zmian w strukturze hipokampa u osób z ASD [Schumann *et al.*, 2004; Groen *et al.*, 2010; Barnea-Goraly *et al.*, 2014; Reinhardt *et al.*, 2020], sugeruje się również różnice w jego funkcjonowaniu i aktywności w stosunku do osób neurotypowych [Banker *et al.*, 2021]. Badania funkcji hipokampa prowadzi się również intensywnie na modelach zwierzęcych. Wykazano iż uszkodzenie tej struktury u szczurzych noworodków prowadziło do zaburzeń zachowań społecznych oraz nadmiernej ruchliwości [Sams-Dodd *et al.*, 1997]. Ponieważ obie struktury mózgu kontrolują zachowania i emocje, sfery zaburzone w autyzmie, a ich dysfunkcje powiązano z ASD, zostały wybrane do badań z wykorzystaniem modelu MIA.

Aby sprawdzić, czy obserwowany na wcześniejszych etapach rozwoju wzrost ekspresji cytokin prozapalnych utrzymuje się w mózgu młodych zwierząt, zbadano ekspresję *Il6*, *Tnf*, *Ifng* oraz *Il1b* w korze mózgu oraz w hipokampie. Zaobserwowano wzrost ekspresji *Il6* oraz *Tnf* wyłącznie w korze mózgu. Wzrost ekspresji i poziomu cytokin prozapalnych w mózgu młodocianych i dorosłych szczurów prenatalnie poddanych działaniu MIA jest dobrze udokumentowany w najnowszej literaturze. Jednak istnieją duże rozbieżności odnośnie stosowanych patogenów, badanych struktur mózgu, czy wieku zwierząt. Clark i wsp. zaobserwowali wzrost ekspresji jedynie *Tnf* w mózgu szczurów z grupy MIA (poli(I:C)) [Clark *et al.*, 2019]. Garay i wsp. zaobserwowali u myszy prenatalnie narażonych na działanie MIA (poli(I:C)) zależne od struktury mózgu i wieku zwierząt zmiany poziomu cytokin prozapalnych (u myszy 30-dniowych: spadek IL-6 i IL-1 β w korze czołowej i w zakręcie obręczy, spadek IL-6 w hipokampie, u myszy 60 dniowych: wzrost IL-6 w korze czołowej, wzrost IFN- γ w zakręcie obręczy, bez zmian w hipokampie) [Garay *et al.*,

2013]. Obserwowano również wzrost ekspresji *Tnf* i *Il1b* w hipokampie (LPS) [Talukdar *et al.*, 2020] czy wzrost poziomu IL-6 i IL-1 β w korze przedczołowej w hipokampie (poli(I:C)) [Ding *et al.*, 2019], natomiast niektórzy badacze nie zaobserwowali zmian [Duchatel *et al.*, 2018].

Podsumowując, wyniki badań niniejszej pracy korespondują z danymi literaturowymi i wskazują, że aktywacja układu odpornościowego matki na wczesnych etapach ciąży wywołuje zmiany w ekspresji cytokin prozapalnych nie tylko w mózgu osesków, ale również u starszego potomstwa, a kora mózgu wydaje się być strukturą bardziej podatną na wpływ MIA niż hipokamp.

Cytokiny prozapalne takie jak IL-1 β , TNF- α , czy IL-6 mogą indukować ekspresję COX-2 (*Ptgs2*) oraz lipoksygenaz (w tym 12-LOX, *Alox12*), których ekspresja rośnie w momencie rozwoju stanu zapalnego [Minghetti, 2004]. Choć w większości tkanek COX-2 występuje jako indukowana izoforma cyklooksygenazy, w OUN zaobserwowano niską, konstytutywną ekspresję COX-2 w neuronach, astrocytach i komórkach mikrogleju. W warunkach fizjologicznych wykazuje ona pozytywny wpływ na plastyczność synaptyczną, jednak nadmierna aktywacja powiązana została z uwalnianiem mediatorów stanu zapalnego [Malec-Milewska, 2015] i wieloma chorobami OUN, np. padaczką i chorobami neurodegeneracyjnymi [Yagami *et al.*, 2016]. Wzrost poziomu COX-2 obserwowano również w mózgu szczurów MIA (poli(I:C)) [Santoni *et al.*, 2023]. Co ciekawe, podanie inhibitora COX-2 (Celecoxib) młodym szczurom prenatalnie poddanym działaniu MIA (poli(I:C)) zapobiegało wystąpieniu pewnych zaburzeń behawioralnych w dalszym życiu [Zavitsanou *et al.*, 2014]. Lipoksygenazy, w tym 12-LOX, poprzez oksydację wielonienasyconych kwasów tłuszczowych biorą udział w produkcji aktywnych biologicznie mediatorów lipidowych, w tym lipoksyn, poprzez które wpływają na przebieg procesów immunologicznych [Zheng *et al.*, 2020]. W niniejszej pracy zaobserwowano wzrost ekspresji *Ptgs2* i *Alox12* w grupie MIA jedynie w korze mózgu, podczas gdy w hipokampie nie wykazano zmian. Koresponduje to ze wzrostem ekspresji genów dla cytokin prozapalnych i dodatkowo podkreśla różnice między badanymi strukturami. Konsekwentnie, aktywacja mikrogleju w mózgu młodych zwierząt z grupy MIA również zależna jest od struktury mózgu. Badania immunohistochemiczne ujawniły kolokalizację białka markerowego mikrogleju Iba-1 z markerem fenotypu „prozapalnego”, IL-1 β , jak również z białkiem markerowym fenotypu „przeciwzapalnego”, Arg-1, w korze mózgu zwierząt z grupy MIA. Sugeruje to wielokierunkową aktywację mikrogleju w tej strukturze

mózgu, zarówno w kierunku fenotypu pro- jak i przeciwzapalnego. Jednocześnie, nie zaobserwowano aktywacji komórek mikroglejowych w hipokampie. Jak wspomniano we Wstępie, zmiany obserwowane w kontekście mikrogleju były wielokrotnie opisywane w modelach MIA, budzą jednak pewne kontrowersje, jako iż uzyskiwane przez badaczy wyniki znacząco się różnią. Wykazano iż prenatalne podanie LPS powodowało zwiększoną proliferację i gęstość komórek mikrogleju w przodomózgowiu zwierząt z grupy MIA [Girard *et al.*, 2010]. Zwiększoną gęstość mikrogleju zaobserwowano również w hipokampie, ale tylko u mysich noworodków, u myszy 80-dniowych prenatalnie poddanych działaniu MIA (poli(I:C)) nie zaobserwowano różnic w stosunku do kontroli [Li *et al.*, 2014]. O’Loughlin i wsp. wykazali zmianę w morfologii mikrogleju w ciele migdałowatym u 40-dniowych myszy z grupy MIA (LPS), gdzie zaobserwowano przeważającą ilość komórek mikrogleju o „aktywowanym” ameboidalnym fenotypie, a jednocześnie ilość komórek o fenotypie rozgałęzionym, „spoczynkowym” była mniejsza niż u kontroli [O’Loughlin *et al.*, 2017]. Inne badania nie wykazały zmian w aktywacji mikrogleju w hipokampie zwierząt z grupy MIA [Giovanoli *et al.*, 2015; Mouihate, 2016]. Wydaje się zatem, iż aktywacja mikrogleju jest zależna od etapu rozwoju potomstwa jak i od struktury mózgu. Badania w niniejszej pracy dowodzą, że aktywacja mikrogleju i wzrost ekspresji mediatorów zapalnych zachodzi w korze mózgu młodych zwierząt po prenatalnej ekspozycji na MIA, zaś hipokamp na tym etapie rozwoju nie wykazuje cech aktywacji procesów zapalnych.

Rozwój stanu zapalnego w OUN może w pewnym stopniu zależeć od toczących się procesów prozapalnych w krwioobiegu [Sun *et al.*, 2022]. Choć zwyczajowo przyjęło się stwierdzenie iż OUN jest rejonem immunologicznie uprzywilejowanym, przede wszystkim dzięki istnieniu BBB, obecnie istnieją przekonujące dowody na to, że OUN nie jest w istocie całkowicie odizolowany od układu immunologicznego działającego na obwodzie [Konsman, 2022]. Niektóre cytokiny są transportowane przez BBB przez specjalne transportery [Banks, 2005], zarówno z obwodu do OUN jak i odwrotnie [Banks, 2008]. Cytokiny uwalniane podczas infekcji mogą przechodzić przez BBB i modulować działanie mikrogleju, szczególnie jeśli dojdzie do uszkodzenia BBB [Sun *et al.*, 2022]. Co więcej, aktywowany mikroglej może przyczyniać się do uszkodzeń BBB [Shigemoto-Mogami *et al.*, 2018]. Wykazano również niekorzystny wpływ dużych stężeń cytokin prozapalnych obecnych we krwi obwodowej w warunkach ogólnoustrojowej reakcji zapalnej na BBB [Huang *et al.*, 2021]. Podejrzewa się również, że uwalniane obwodowo cytokiny mogą

oddziaływać na OUN poprzez aferentne włókna układu autonomicznego np. nerw błędny [Ufnal & Wołynczyk-Gmaj, 2011].

Zbadano wobec tego poziom cytokin prozapalnych w surowicy krwi i wykazano wzrost poziomu IL-1 β , IFN- γ , IL-6, TNF- α oraz IL-17a u potomstwa z grupy MIA w stosunku do kontroli. W innych pracach także wykazano wzrost poziomu TNF- α oraz IL-17a w osoczu zarówno po podaniu LPS jak i poli(I:C), oraz IL-6 po poli(I:C) [Talukdar *et al.*, 2020]. Garay i wsp. wykazali wzrost poziomu IL-1 β i IL-6 w surowicy 30-dniowych zwierząt z grupy MIA, podczas gdy IFN- γ , TNF- α oraz IL-17a pozostawały bez zmian [Garay *et al.*, 2013]. Badania na małpach również wykazały utrzymujący się podwyższony poziom cytokin prozapalnych w osoczu, u rocznych zwierząt zaobserwowano podwyższone między innymi TNF α oraz IFN γ , a u 4-letnich zwierząt wykazano podwyższony poziom IL-6 [Rose *et al.*, 2017]. Warto wspomnieć iż wysoki poziom cytokin prozapalnych, między innymi IL-6, TNF α , IFN γ , był obserwowany u osób z ASD we krwi, mózgu czy w płynie mózgowo-rdzeniowym [Xu *et al.*, 2015]. Wobec tego, nie można wykluczyć, iż przyczyną aktywacji mikrogleju w korze mózgu mogą być mediatory prozapalne pochodzące z krwioobiegu.

Jak już wcześniej wspomniano stres oksydacyjny jest nieodłącznym stanem towarzyszącym toczącej się reakcji zapalnej. Zwiększona fluorescencja sondy DCF zarówno w korze mózgu jak i w hipokampie młodych zwierząt MIA w porównaniu do kontroli, a także wzrost poziomu O $_2^{\cdot-}$ w hipokampie, z tendencją wzrostową w korze mózgu wskazuje wyraźnie na obecność dużej ilości RFT w badanych strukturach. Uzyskane wyniki badań sugerują odmienne pochodzenie reaktywnych wolnych rodników w badanych strukturach mózgu. W korze mózgu nie zaobserwowano aktywacji oksydazy NADPH, a ekspresja *Nox1*, *Cybb* i *Nox4* spadała w stosunku do kontroli, co wskazuje, że NOX nie jest źródłem RFT w tej strukturze mózgu. Z kolei, w hipokampie wykazano wyraźny wzrost aktywności NOX w stosunku do kontroli, czemu towarzyszył wzrost ekspresji *Nox1* i *Nox4*. Stres oksydacyjny w zwierzęcym modelu MIA wykazały też inne grupy badawcze w ostatnich latach. Zaobserwowano m.in. peroksydację lipidów w hipokampie 37-dniowych zwierząt prenatalnie narażonych na LPS, a także wzrost poziomu 3-nitrotyrozyny [da Rosa *et al.*, 2021]. W niniejszej pracy nie zaobserwowano zmian poziomu 3-nitrotyrozyny na żadnym z badanych etapów rozwoju potomstwa mimo znaczącego wzrostu poziomu wolnych rodników. Na obecność stresu oksydacyjnego wskazują również badania Talukdar i wsp., w których wykazano obniżony poziom

antyoksydantów oraz peroksydację lipidów w hipokampie zwierząt narażonych prenatalnie na LPS lub poli(I:C) [Talukdar *et al.*, 2020]. Obserwowane przez Talukdar i wsp. osłabienie systemu antyoksydacyjnego koresponduje z wynikami otrzymanymi w tej pracy. Chociaż na wcześniejszym etapie rozwoju, w mózgu 7-dniowych osesków wykazano niewielką aktywację mechanizmów obrony antyoksydacyjnej, to w mózgu młodego potomstwa MIA systemy ochrony przed RFT wydają się być niewydolne. Wykazano obniżenie stosunku GSH/GSSG w obu strukturach mózgu, co świadczy o zaburzonym układzie przeciwutleniającym związanym z glutationem. Warto nadmienić iż w mózgu osób z ASD również obserwowano zmniejszony stosunek GSH/GSSG [Rose *et al.*, 2012]. Co więcej, w niniejszej pracy zaobserwowano spadek poziomu Nrf2 w hipokampie, któremu towarzyszył spadek ekspresji podległych mu genów *Sod1* i *Sod2*. W korze mózgu poziom Nrf2 wykazywał tendencję spadkową, zaobserwowano też zmniejszoną ekspresję *Sod2*. Badania wskazują zatem na obecność stresu oksydacyjnego w mózgu młodego potomstwa MIA, źródłem wolnych rodników w hipokampie może być m.in. oksydaza NADPH, podczas gdy w korze mózgu enzym nie jest aktywowany.

Jak pisano we Wstępie, nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów obserwuje się u pacjentów z ASD. Wśród obserwowanych dysfunkcji mitochondriów wymienia się zaburzenia kompleksów mitochondrialnych, takie jak zależna od struktury mózgu zmniejszona ekspresja kompleksu I, kompleksu III, kompleksu IV i kompleksu V [Anitha *et al.*, 2013], jak również spadek poziomu białka poszczególnych podjednostek [Chauhan *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2013b]. Zmiany w poziomie białek miały swoje odzwierciedlenie w obniżonej aktywności kompleksów, głównie I i V, ale też kompleksu III w korze przedczołowej u osób z ASD [Gu *et al.*, 2013]. Zważywszy iż kompleksy I i III są głównymi producentami RFT w mitochondriach, a kompleks V jest bezpośrednio zaangażowany w syntezę ATP, dysfunkcja wymienionych kompleksów może mieć związek zarówno ze zmniejszoną produkcją energii jak i z podwyższoną generacją RFT, co przyczynia się do rozwoju stresu oksydacyjnego, obserwowanego u osób z ASD. Zaobserwowano również zmiany w ekspresji genów regulujących transport mitochondrialny, utrzymywanie potencjału błonowego oraz fuzję i fragmentację mitochondriów [Anitha *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013b]. Badania wykonane w niniejszej pracy wykazały, iż aktywacja układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży powoduje znaczące zaburzenia mitochondrialne na wielu płaszczyznach funkcjonowania tych organelli w mózgu młodych zwierząt potomnych.

U 52-dniowych szczurów z grupy MIA, podobnie jak u 7-dniowych osesków, wykazano obniżenie mitochondrialnego potencjału błonowego oraz spadek poziomu ATP, zarówno w korze mózgu jak i w hipokampie. Zmiany mitochondrialne w mózgu starszych zwierząt są jednak znacznie poważniejsze niż u osesków, wykazano zaburzenie funkcjonowania łańcucha transportu elektronów. Szczególnie w korze mózgu, gdzie dochodzi do obniżenia ekspresji genów dla podjednostek kompleksów CI, CIII i CIV (odpowiednio *mt-Nd1*, *mt-Cyb*, *mt-Co1*), przy jednoczesnym spadku aktywności tych kompleksów. Natomiast w hipokampie spadła ekspresja genów dla CI oraz CIV, a spadek aktywności zaobserwowano w przypadku CI i CIII. Ponieważ CI oraz CIII są uważane za głównych producentów RFT w łańcuchu oddechowym [Bleier & Dröse, 2013], wydaje się iż w mózgu młodych zwierząt, to właśnie łańcuch transportu elektronów może być głównym źródłem obserwowanych RFT, szczególnie w korze mózgu, gdzie nie dochodzi do zwiększenia aktywności NOX. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki sugerują, że w hipokampie RFT produkowane są zarówno w mitochondriach, w procesie fosforylacji oksydacyjnej jak i przez aktywowaną oksydazę NADPH. Niższy potencjał błonowy oraz spadek poziomu ATP, a także obniżona ekspresja i aktywność kompleksów mogą sugerować iż mitochondria są najprawdopodobniej sprzężone, a obserwowane dysfunkcje mają swoje źródło w zaburzonej fosforylacji oksydacyjnej. Co więcej, zmiany w poziomie mRNA sugerują szerszy kontekst zaburzeń indukowanych przez MIA, jako iż mogą być one powodowane przez szeroki wachlarz czynników, w tym indukowane przez RFT zakłócenia transkrypcji [Oh *et al.*, 2020] lub nawet modyfikacje epitranskryptomyczne [Chokkalla *et al.*, 2022].

Wpływ MIA zaobserwowano również w kontekście dynamiki mitochondriów w korze mózgu. Nie zaobserwowano co prawda większych zmian w procesie fuzji, nie zmieniała się ekspresja ani poziom białek Mfn1, Mfn2 i Opa1, wzrósł natomiast stosunek S-Opa1/L-Opa1, co sugeruje hamowanie fuzji mitochondriów i przechylenie szali na rzecz ich fragmentacji. Jak wcześniej opisano długa forma białka, L-Opa1 może być cięta przez proteazy, w wyniku czego powstają rozpuszczalne, krótsze formy S-Opa1. W warunkach fizjologicznych proteoliza Opa1 prowadzi do powstania zrównoważonego poziomu krótkich i długich form tego białka, a fuzja mitochondriów przebiega prawidłowo. Z kolei spadek potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej prowadzi do aktywacji mitochondrialnych proteaz i cięcia L-Opa1, wzrasta wówczas ilość S-Opa1, a fuzja mitochondriów zostaje zahamowana. Fragmentacja wydaje się być bardziej intensywna

przede wszystkim z powodu zmian GTP-azy Drp1. Po pierwsze wzrasta ekspresja genu *Dnm1l* kodującego Drp1, poza tym zwiększa się stosunek p-Drp1(Ser616)/Drp1, co wskazuje na zwiększoną fosforylację Drp1 na serynie 616. Jak wspomniano wcześniej, białko Drp1 podlega różnorodnym modyfikacjom potranslacyjnym (m.in. s-nitrozylacja, sumoilacja, czy fosforylacja [Partyka *et al.*, 2016]). Fosforylacja Ser616 zwiększa aktywność Drp1 i promuje jego translokację z cytoplazmy do zewnętrznej błony mitochondrialnej. Zwiększoną fragmentację potwierdzają również zmiany w białku GDAP1. Białko to, tradycyjnie badane w kontekście choroby Charcot-Marie-Tooth, produkowane jest głównie w komórkach nerwowych, gdzie zlokalizowane jest w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i peroksysomach. GDAP1 powiązane z fragmentacją mitochondriów, ich transportem, utrzymaniem homeostazy wapnia oraz podziałem peroksysomów [Kochański *et al.*, 2018]. W korze mózgu zaobserwowano wzrost poziomu tego białka. Wydaje się zatem, iż w korze mózgu zwierząt z grupy MIA dochodzi do promowania fragmentacji mitochondriów. Co ciekawe, podobnych zmian nie zaobserwowano w hipokampie. W tej strukturze wykazano spadek ekspresji *Mfn1*, *Mfn2* i *Opal*, nie mający jednak odzwierciedlenia w poziomie białka. Chociaż odnotowano wzrost stosunku S-Opal/L-Opal, to białka związane z fragmentacją nie zmieniały się, co sugeruje brak istotnych zmian w dynamice mitochondriów w hipokampie. Należy wspomnieć, iż zmiany w dynamice mitochondriów obserwowano u osób z ASD. Wykazano między innymi spadek poziomu białek związanych z fuzją, a wzrost poziomu białek związanych z fragmentacją w korze skroniowej dzieci i nastolatków z ASD [Tang *et al.*, 2013b]. Obserwowano również zwiększoną ekspresję zarówno genów związanych z fuzją jak i fragmentacją (*Mfn1*, *Mfn2*, *Fis1*, *Dnm1l*) w fibroblastach pozyskanych od pacjentów z ASD [Pecorelli *et al.*, 2020].

W kontekście obserwowanych zaburzeń w funkcjonowaniu mitochondriów, szczególnie dysfunkcji łańcucha oddechowego, zwiększona fragmentacja byłaby zjawiskiem pozytywnym i protekcyjnym, jeśli towarzyszyłoby jej intensywne usuwanie upośledzonych organelli. Badania wykazały jednak, iż w obu strukturach mózgu mitofagia zależna od PINK1 i Parkiny nie jest aktywowana. Co więcej, podejrzewa się, iż istnieje powiązanie między ASD a zaburzeniami mitofagii. W istocie, wykazano iż mutacje w genach *WDFY3*, *AMBRA1* i *PARK2* skutkują zaburzeniami mitofagii oraz wywołują objawy ASD-podobne [Napoli *et al.*, 2018; Crespi *et al.*, 2019; Dalla Vecchia *et al.*, 2019; Le Duc *et al.*, 2019]. Obserwowany w niniejszej pracy brak zmian w poziomie białek

związanych z mitofagią oraz brak translokacji Parkiny do mitochondriów wskazuje na zaburzenie homeostazy mitochondrialnej w mózgu potomstwa MIA. Może to oznaczać obecność dużej puli uszkodzonych, niewydolnych mitochondriów. Dodatkowo, w obu strukturach mózgu wykazano obniżoną aktywność syntazy cytrynianowej, markera ilości mitochondriów. To, w połączeniu z obniżeniem ekspresji *Ppargc1*, *Nrf1* i *Tfam* w korze mózgu, oraz *Tfam* w hipokampie, może sugerować zaburzenia w funkcjonowaniu procesu biogenezy mitochondriów, co z kolei w połączeniu z nieefektywną mitofagią przyczyniałyby się do zmniejszenia puli zdrowych, funkcjonalnych mitochondriów.

Na chwilę obecną niewiele jest badań na modelach zwierzęcych które mogłyby pomóc wyjaśnić wątpliwości związane zaburzeniami mitochondriów w MIA. Nieliczne dostępne wyniki innych grup badawczych również wskazywały na pewne aspekty zaburzeń mitochondrialnych w warunkach aktywacji matczynego układu odpornościowego, między innymi zmiany w mitochondriach komórek układu odpornościowego potomstwa (poli(I:C)) [Giulivi *et al.*, 2013], zmiany aktywności kompleksów mitochondrialnych w mózdzku (poli(I:C)) [Naviaux *et al.*, 2013], czy ekspresji białek związanych z łańcuchem oddechowym oraz cyklem Krebsa w korze przedczołowej (poli(I:C)) [Farrelly *et al.*, 2015].

Opisane wyżej zmiany mają również odzwierciedlenie w morfologii mitochondriów. W niniejszej pracy po raz pierwszy wykonano analizę ultrastruktury mitochondriów w modelu MIA, z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Wykazano, że ultrastruktura mitochondriów w grupie MIA odbiega od organelli zwierząt kontrolnych.

W grupie MIA widoczne były mitochondria o zatartej strukturze grzebieni mitochondrialnych, a w niektórych organellach zaobserwowano wręcz ubytek grzebieni. Wydaje się, iż obserwowane zmiany można powiązać z wysokim poziomem RFT. Nadmiar RFT prowadzi do uszkodzenia białek i peroksydacji lipidów, może więc wpływać destrukcyjnie na bogate w te składniki błony komórkowe [Shields *et al.*, 2021], co na poziomie morfologii błony może przedstawiać się jako zatarta struktura [Pawlak *et al.*, 2022]. Ciągłość grzebieni mitochondrialnych jest niezbędna dla zachodzenia fosforylacji oksydacyjnej i syntezy ATP [Ikon & Ryan, 2017], zatem uszkodzenie wewnętrznej błony mitochondrialnej przekłada się bezpośrednio na funkcjonowanie mitochondrium. Co interesujące, mitochondria o zatartej strukturze i ubytku grzebieni obserwowano w fibroblastach pochodzących od pacjentek z zespołem Retta [Cicaloni *et al.*, 2020]. Zaburzenie to często współwystępuje z ASD, ok. 60% kobiet z zespołem Retta otrzymuje również diagnozę ASD [Fetit *et al.*, 2021]. Dodatkowo, wśród mitochondriów z grupy MIA

zaobserwowano organella o zatartej strukturze OMM, a także takie o przerwanej ciągłości błony.

Część mitochondriów z grupy MIA charakteryzowało się jasną macierzą mitochondrialną. Tego typu zmiana jest cechą obrzęku mitochondriów. Obrzęk macierzy zwykle związany jest ze zwiększoną przepuszczalnością OMM i IMM, zmniejszonym potencjałem błonowym, a także zwiększonym napływem jonów (przede wszystkim Ca^{2+} i K^{+}), co wiąże się z gromadzeniem wody we wnętrzu mitochondrium [Javadov *et al.*, 2018]. Co więcej, otwarcie megakanałów mitochondrialnych (ang. mitochondrial permeability transition pores, MPTPs) prowadzące do znacznego obrzęku mitochondriów powiązane zostało z wysokim poziomem RFT [Kwong & Molkentin, 2015]. Wydaje się iż prenatalna ekspozycja na MIA powoduje zmiany w ultrastrukturze mitochondriów w korze mózgu i hipokampie młodych dorosłych zwierząt. Obserwowane zmiany ultrastrukturalne mogą przekładać się na pozostałe zaburzenia mitochondrialne obserwowane u badanych zwierząt.

11.5. Podsumowanie

Podsumowując, badania prowadzone w tej pracy są pierwszymi analizującymi tak szerokie spektrum zmian związanych z dysfunkcją mitochondriów w mózgu potomstwa po aktywacji układu odpornościowego matki we wczesnej ciąży. Zidentyfikowano charakter zaburzeń mitochondrialnych na różnych etapach rozwoju mózgu i wykazano, że na wczesnych etapach życia nie są one jeszcze tak spektakularne jak w mózgu młodego potomstwa. Sugeruje się, że u płodów oraz w mózgu osesków kluczową rolę pełni aktywacja oksydazy NADPH. Uwalniany w nadmiarze przez ten enzym anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$) może przyczyniać się do zmian mitochondrialnego potencjału błonowego, a następnie do postępującego uszkodzenia mitochondriów. Jednak dokładną rolę tego enzymu w powstawaniu obserwowanych zaburzeń należałoby potwierdzić w kolejnych badaniach. W miarę dojrzewania zwierząt zaburzenia mitochondrialne pogłębiają się, spada aktywność kompleksów łańcucha transportu elektronów oraz dochodzi do zaburzenia dynamiki tych organelli z przechyleniem szali w kierunku fragmentacji. Jednocześnie nie obserwuje się zwiększonego usuwania uszkodzonych mitochondriów na drodze autofagii. Może to prowadzić do zwiększenia puli dysfunkcyjnych organelli o zaburzonej ultrastrukturze. Uszkodzone mitochondria mogą intensywnie generować reaktywne formy tlenu oraz uwalniać inne czynniki, takie jak

mtDNA, indukujące procesy prozapalne w mózgu, wywołując tak zwane „mito-inflammation”. Potwierdzenie tych hipotez wymaga jednak dalszych szczegółowych badań. Zmiany w korze mózgu wydają się bardziej dotkliwe, niż te obserwowane w hipokampie, co sugeruje iż ta struktura mózgu jest bardziej wrażliwa na działanie MIA. Uzyskane wyniki badań sugerują, że mitochondria mogą być potencjalnym celem dla nowych metod terapii autyzmu wywołanego infekcją matki na wczesnych etapach ciąży.

12. Wnioski

- 1) W mózgu osesków prenatalnie narażonych na działanie MIA dochodzi do obniżenia potencjału błony mitochondrialnej oraz spadku produkcji ATP, mimo prawidłowo funkcjonującego łańcucha transportu elektronów. Brak aktywacji procesu mitofagii wskazuje na nieefektywne usuwanie organelli o obniżonym potencjale błonowym, co może prowadzić do akumulacji mitochondriów o zmniejszonej funkcjonalności.
- 2) Zależny od MIA rozwój procesów prozapalnych oraz aktywacja oksydazy NADPH i uwalnianie rodnika $O_2^{\cdot-}$ na bardzo wczesnym etapie życia płodowego mogą być odpowiedzialne za uszkodzenia mitochondriów już w czasie życia płodowego.
- 3) Indukowane przez MIA nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów pogłębiają się z wiekiem. W mózgu młodego potomstwa dochodzi do poważnych zaburzeń w funkcjonowaniu łańcucha transportu elektronów na poziomie ekspresji genów oraz aktywności podjednostek łańcucha oddechowego. Pojawiają się również zmiany w dynamice mitochondriów.
- 4) Zaburzenia funkcji mitochondriów w mózgu młodego potomstwa zależne są od struktury mózgu. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów są wyraźniejsze w korze mózgu niż w hipokampie.
- 5) Aktywacja układu odpornościowego matki w ciąży indukuje u potomstwa ASD-podobne zmiany behawioralne na różnych etapach życia. Zaburzenia zachowań społecznych widoczne są zarówno u osesków jak i u młodych zwierząt potomnych.

13. Spis piśmiennictwa

1. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*. American Psychiatric Association.
2. Abareshi, A., Anaeigoudari, A., Norouzi, F., Marefati, N., Beheshti, F., Saeedjalali, M., Hosseini, M. (2019). The effects of captopril on lipopolysaccharide-induced sickness behaviors in rats. *Vet Res Forum*, 10(3), 199-205.
3. Abruzzo, P.M., Matté, A., Bolotta, A., Federti, E., Ghezzi, A., Guarnieri, T., Marini, M., Posar, A., Siciliano, A., De Franceschi, L., Visconti, P. (2019). Plasma peroxiredoxin changes and inflammatory cytokines support the involvement of neuro-inflammation and oxidative stress in Autism Spectrum Disorder. *J Transl Med*, 17(1), 332.
4. Agoston, D.V. (2017). How to Translate Time? The Temporal Aspect of Human and Rodent Biology. *Frontiers in Neurology*, 8.
5. Ahmed, S.M., Luo, L., Namani, A., Wang, X.J., Tang, X. (2017). Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863(2), 585-597.
6. Al-Ayadhi, L.Y., Mostafa, G.A. (2012). Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism. *J Neuroinflammation*, 9, 158.
7. Al Sagheer, T., Haida, O., Balbous, A., Francheteau, M., Matas, E., Fernagut, P.O., Jaber, M. (2018). Motor Impairments Correlate with Social Deficits and Restricted Neuronal Loss in an Environmental Model of Autism. *Int J Neuropsychopharmacol*, 21(9), 871-882.
8. Alampi, J.D., Lanphear, B.P., Braun, J.M., Chen, A., Takaro, T.K., Muckle, G., Arbuckle, T.E., McCandless, L.C. (2021). Association Between Gestational Exposure to Toxicants and Autistic Behaviors Using Bayesian Quantile Regression. *American Journal of Epidemiology*, 190(9), 1803-1813.
9. Amici, S.A., Dong, J., Guerau-de-Arellano, M. (2017). Molecular Mechanisms Modulating the Phenotype of Macrophages and Microglia. *Frontiers in Immunology*, 8.
10. Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 200-214.
11. Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkova, N.N., Starkov, A.A. (2020). Metabolic ROS Signaling: To Immunity and Beyond. *Biochemistry (Moscow)*, 85(12), 1650-1667.
12. Angelova, P.R., Abramov, A.Y. (2018). Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Letters*, 592(5), 692-702.
13. Anitha, A., Nakamura, K., Thanseem, I., Matsuzaki, H., Miyachi, T., Tsujii, M., Iwata, Y., Suzuki, K., Sugiyama, T., Mori, N. (2013). Downregulation of the expression of mitochondrial electron transport complex genes in autism brains. *Brain Pathol*, 23(3), 294-302.
14. Anitha, A., Nakamura, K., Thanseem, I., Yamada, K., Iwayama, Y., Toyota, T., Matsuzaki, H., Miyachi, T., Yamada, S., Tsujii, M., Tsuchiya, K.J., Matsumoto, K., Iwata, Y., Suzuki, K., Ichikawa, H., Sugiyama, T., Yoshikawa, T., Mori, N. (2012). Brain region-specific altered expression and association of mitochondria-related genes in autism. *Molecular Autism*, 3(1), 12.
15. Antonson, A.M., Balakrishnan, B., Radlowski, E.C., Petr, G., Johnson, R.W. (2018). Altered Hippocampal Gene Expression and Morphology in Fetal Piglets following Maternal Respiratory Viral Infection. *Developmental Neuroscience*, 40(2), 104-119.

16. Argilés, J.M., Carbó, N., López-Soriano, F.J. (1997). TNF and pregnancy: the paradigm of a complex interaction. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 8(3), 181-188.
17. Aria, F., Bonini, S.A., Cattaneo, V., Premoli, M., Mastinu, A., Maccarinelli, G., Memo, M. (2020). Brain Structural and Functional Alterations in Mice Prenatally Exposed to LPS Are Only Partially Rescued by Anti-Inflammatory Treatment. *Brain Sciences*, 10(9), 620.
18. Arsenault, D., St-Amour, I., Cisbani, G., Rousseau, L.S., Cicchetti, F. (2014). The different effects of LPS and poly I:C prenatal immune challenges on the behavior, development and inflammatory responses in pregnant mice and their offspring. *Brain Behav Immun*, 38, 77-90.
19. Ashdown, H., Dumont, Y., Ng, M., Poole, S., Boksa, P., Luheshi, G.N. (2006). The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 11(1), 47-55.
20. Atladóttir, H., Henriksen, T.B., Schendel, D.E., Parner, E.T. (2012). Autism after infection, febrile episodes, and antibiotic use during pregnancy: an exploratory study. *Pediatrics*, 130(6), e1447-1454.
21. Atladóttir, H.O., Thorsen, P., Østergaard, L., Schendel, D.E., Lemcke, S., Abdallah, M., Parner, E.T. (2010). Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 40(12), 1423-1430.
22. Ayaydin, H., Akaltun, İ., Koyuncu, İ., ÇelİK, H., Kırmıt, A., Takatak, H. (2020). High KEAP1, NRF2 and Low HO-1 Serum Levels in Children with Autism. *Noro Psikiyatr Ars*, 57(4), 274-279.
23. Baharnoori, M., Bhardwaj, S.K., Srivastava, L.K. (2012). Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. *Schizophr Bull*, 38(3), 444-456.
24. Bai, D., Yip, B.H.K., Windham, G.C., Sourander, A., Francis, R., Yoffe, R., Glasson, E., Mahjani, B., Suominen, A., Leonard, H., Gissler, M., Buxbaum, J.D., Wong, K., Schendel, D., Kodesh, A., Breshnahan, M., Levine, S.Z., Parner, E.T., Hansen, S.N., Hultman, C., Reichenberg, A., Sandin, S. (2019). Association of Genetic and Environmental Factors With Autism in a 5-Country Cohort. *JAMA Psychiatry*, 76(10), 1035-1043.
25. Baines, K.J., Hillier, D.M., Haddad, F.L., Rajakumar, N., Schmid, S., Renaud, S.J. (2020). Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development and Enhances Proliferation of Neural Precursor Cells in Rats. *Frontiers in Immunology*, 11.
26. Bandoowala, M., Sengupta, P. (2020). 3-Nitrotyrosine: a versatile oxidative stress biomarker for major neurodegenerative diseases. *International Journal of Neuroscience*, 130(10), 1047-1062.
27. Banker, S.M., Gu, X., Schiller, D., Foss-Feig, J.H. (2021). Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in autism spectrum disorder. *Trends in Neurosciences*, 44(10), 793-807.
28. Banks, A.W. (2005). Blood-Brain Barrier Transport of Cytokines: A Mechanism for Neuropathology. *Current Pharmaceutical Design*, 11(8), 973-984.
29. Banks, W.A. (2008). Blood-Brain Barrier Transport of Cytokines. In *NeuroImmune Biology*, Elsevier, pp. 93-107.
30. Baran, P., Hansen, S., Waetzig, G.H., Akbarzadeh, M., Lamertz, L., Huber, H.J., Ahmadian, M.R., Moll, J.M., Scheller, J. (2018). The balance of interleukin (IL)-6, IL-6-soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6·sIL-6R·sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *J Biol Chem*, 293(18), 6762-6775.

31. Barnea-Goraly, N., Frazier, T.W., Piacenza, L., Minshew, N.J., Keshavan, M.S., Reiss, A.L., Hardan, A.Y. (2014). A preliminary longitudinal volumetric MRI study of amygdala and hippocampal volumes in autism. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 48, 124-128.
32. Bélanger, M., Allaman, I., Magistretti, P.J. (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab*, 14(6), 724-738.
33. Bereiter-Hahn, J., Jendrach, M. (2010). Chapter One - Mitochondrial Dynamics. In K.W. Jeon (Ed.) *International Review of Cell and Molecular Biology*, Academic Press, pp. 1-65.
34. Biswas, S.K. (2016). Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 5698931.
35. Bjørklund, G., Meguid, N.A., El-Bana, M.A., Tinkov, A.A., Saad, K., Dadar, M., Hemimi, M., Skalny, A.V., Hosnedlová, B., Kizek, R., Osredkar, J., Urbina, M.A., Fabjan, T., El-Houfey, A.A., Kałużna-Czaplińska, J., Gałtarek, P., Chirumbolo, S. (2020). Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. *Molecular Neurobiology*, 57(5), 2314-2332.
36. Bleier, L., Dröse, S. (2013). Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(11), 1320-1331.
37. Bockhorst, K.H., Narayana, P.A., Liu, R., Ahobila-Vijjula, P., Ramu, J., Kamel, M., Wosik, J., Bockhorst, T., Hahn, K., Hasan, K.M., Perez-Polo, J.R. (2008). Early postnatal development of rat brain: In vivo diffusion tensor imaging. *Journal of Neuroscience Research*, 86(7), 1520-1528.
38. Boksa, P. (2010). Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun*, 24(6), 881-897.
39. Borst, K., Dumas, A.A., Prinz, M. (2021). Microglia: Immune and non-immune functions. *Immunity*, 54(10), 2194-2208.
40. Boulanger-Bertolus, J., Mouly, A.M. (2021). Ultrasonic Vocalizations Emission across Development in Rats: Coordination with Respiration and Impact on Brain Neural Dynamics. *Brain Sci*, 11(5).
41. Boulanger-Bertolus, J., Pancaro, C., Mashour, G.A. (2018). Increasing Role of Maternal Immune Activation in Neurodevelopmental Disorders. *Front Behav Neurosci*, 12, 230.
42. Brandes, R.P., Weissmann, N., Schröder, K. (2010). NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, 49(5), 687-706.
43. Brandes, R.P., Weissmann, N., Schröder, K. (2014). Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 76, 208-226.
44. Brion, C., Lutz, S.M., Albert, F.W. (2020). Simultaneous quantification of mRNA and protein in single cells reveals post-transcriptional effects of genetic variation. *Elife*, 9, e60645.
45. Brown, A.S., Sourander, A., Hinkka-Yli-Salomäki, S., McKeague, I.W., Sundvall, J., Surcel, H.M. (2014). Elevated maternal C-reactive protein and autism in a national birth cohort. *Mol Psychiatry*, 19(2), 259-264.
46. Brudzynski, S.M. (2021). Biological Functions of Rat Ultrasonic Vocalizations, Arousal Mechanisms, and Call Initiation. *Brain Sciences*, 11(5), 605.
47. Bukowska, D., Kempisty, B., Ciesiolka, S., Piotrowska, H., Antosik, P., Jaskowski, J., Nowicki, M. (2014). Rola hormonów oraz czynników wzrostowych w implantacji zarodka u ssaków. *Medycyna Weterynaryjna*, 70(03).

48. Cadenas, S. (2018). Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1859(9), 940-950.
49. Cadwell, C.R., Bhaduri, A., Mostajo-Radji, M.A., Keefe, M.G., Nowakowski, T.J. (2019). Development and Arealization of the Cerebral Cortex. *Neuron*, 103(6), 980-1004.
50. Cai, Z., Pan, Z.-L., Pang, Y., Evans, O.B., Rhodes, P.G. (2000). Cytokine Induction in Fetal Rat Brains and Brain Injury in Neonatal Rats after Maternal Lipopolysaccharide Administration. *Pediatric Research*, 47(1), 64-64.
51. Campolongo, M., Kazlauskas, N., Falasco, G., Urrutia, L., Salgueiro, N., Höcht, C., Depino, A.M. (2018). Sociability deficits after prenatal exposure to valproic acid are rescued by early social enrichment. *Mol Autism*, 9, 36.
52. Camporeale, A., Poli, V. (2012). IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in autoimmunity? *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17(6), 2306-2326.
53. Canetta, S., Bolkan, S., Padilla-Coreano, N., Song, L.J., Sahn, R., Harrison, N.L., Gordon, J.A., Brown, A., Kellendonk, C. (2016). Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. *Molecular Psychiatry*, 21(7), 956-968.
54. Caputa, M., Dokladny, K., Kurowicka, B., Rogalska, J. (2004). Brain and body temperature changes and behavior of rats injected with various doses of endotoxin. *Acta Biol Cracov Ser Zool*, 46, 13-25.
55. Carbone, E., Buzzelli, V., Manduca, A., Leone, S., Rava, A., Trezza, V. (2023). Maternal Immune Activation Induced by Prenatal Lipopolysaccharide Exposure Leads to Long-Lasting Autistic-like Social, Cognitive and Immune Alterations in Male Wistar Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3920.
56. Carpentier, P.A., Dingman, A.L., Palmer, T.D. (2011). Placental TNF- α signaling in illness-induced complications of pregnancy. *Am J Pathol*, 178(6), 2802-2810.
57. Casazza, R.L., Lazear, H.M., Miner, J.J. (2020). Protective and Pathogenic Effects of Interferon Signaling During Pregnancy. *Viral Immunol*, 33(1), 3-11.
58. Čater, M., Križančić Bombek, L. (2022). Protective Role of Mitochondrial Uncoupling Proteins against Age-Related Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Antioxidants*, 11(8), 1473.
59. Chatterjee, P., Chiasson, V.L., Bounds, K.R., Mitchell, B.M. (2014). Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Frontiers in Immunology*, 5.
60. Chatterjee, S. (2016). Chapter Two - Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. In T. Dziubla, D.A. Butterfield (Eds.), *Oxidative Stress and Biomaterials*, Academic Press, pp. 35-58.
61. Chauhan, A., Gu, F., Essa, M.M., Wegiel, J., Kaur, K., Brown, W.T., Chauhan, V. (2011). Brain region-specific deficit in mitochondrial electron transport chain complexes in children with autism. *J Neurochem*, 117(2), 209-220.
62. Chavali, P.L., Ramachandran, R., Chavali, S. (2020). Chapter 3 - Functional categories of RNA regulation. In R. Pandey (Ed.) *Rna-Based Regulation in Human Health and Disease*, Academic Press, pp. 59-83.
63. Checa, J., Aran, J.M. (2020). Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J Inflamm Res*, 13, 1057-1073.
64. Chen, C.-T., Hsu, S.-H., Wei, Y.-H. (2010). Upregulation of mitochondrial function and antioxidant defense in the differentiation of stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1800(3), 257-263.

65. Chen, L., Qin, Y., Liu, B., Gao, M., Li, A., Li, X., Gong, G. (2022). PGC-1 α -Mediated Mitochondrial Quality Control: Molecular Mechanisms and Implications for Heart Failure. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10.
66. Chen, L., Shi, X.-J., Liu, H., Mao, X., Gui, L.-N., Wang, H., Cheng, Y. (2021). Oxidative stress marker aberrations in children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis of 87 studies (N = 9109). *Translational Psychiatry*, 11(1), 15.
67. Cheng, K., Chen, Y.-s., Yue, C.-x., Zhang, S.-m., Pei, Y.-P., Cheng, G.-r., Liu, D., Xu, L., Dong, H.-x., Zeng, Y. (2019). Calsyntenin-1 Negatively Regulates ICAM5 Accumulation in Postsynaptic Membrane and Influences Dendritic Spine Maturation in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Frontiers in Neuroscience*, 13.
68. Chess, S. (1977). Follow-up report on autism in congenital rubella. *J Autism Child Schizophr*, 7(1), 69-81.
69. Chiarotti, F., Venerosi, A. (2020). Epidemiology of Autism Spectrum Disorders: A Review of Worldwide Prevalence Estimates Since 2014. *Brain Sci*, 10(5).
70. Choi, G.B., Yim, Y.S., Wong, H., Kim, S., Kim, H., Kim, S.V., Hoeffler, C.A., Littman, D.R., Huh, J.R. (2016). The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, 351(6276), 933-939.
71. Chojnicka, I., Pisula, E. (2017). Adaptation and Validation of the ADOS-2, Polish Version. *Frontiers in Psychology*, 8.
72. Chojnicka, I., Płoski, R. (2012). Polska wersja wywiadu do diagnozowania autyzmu ADI-R (Autism Diagnostic Interview–Revised). *Psychiatr Pol*, 46(2), 249-259.
73. Chokkalla, A.K., Mehta, S.L., Vemuganti, R. (2022). Epitranscriptomic Modifications Modulate Normal and Pathological Functions in CNS. *Transl Stroke Res*, 13(1), 1-11.
74. Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
75. Christensen, J., Grønberg, T.K., Sørensen, M.J., Schendel, D., Parner, E.T., Pedersen, L.H., Vestergaard, M. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *Jama*, 309(16), 1696-1703.
76. Chudnovets, A., Lei, J., Na, Q., Dong, J., Narasimhan, H., Klein, S.L., Burd, I. (2020). Dose-dependent structural and immunological changes in the placenta and fetal brain in response to systemic inflammation during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 84(1), e13248.
77. Cicaloni, V., Pecorelli, A., Tinti, L., Rossi, M., Benedusi, M., Cervellati, C., Spiga, O., Santucci, A., Hayek, J., Salvini, L., Tinti, C., Valacchi, G. (2020). Proteomic profiling reveals mitochondrial alterations in Rett syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, 155, 37-48.
78. Clark, S.M., Notarangelo, F.M., Li, X., Chen, S., Schwarcz, R., Tonelli, L.H. (2019). Maternal immune activation in rats blunts brain cytokine and kynurenine pathway responses to a second immune challenge in early adulthood. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 89, 286-294.
79. Cogley, J.N., Fiorello, M.L., Bailey, D.M. (2018). 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol*, 15, 490-503.
80. Collins, L.V., Hajizadeh, S., Holme, E., Jonsson, I.-M., Tarkowski, A. (2004). Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(6), 995-1000.

81. Comrie, A.E., Frank, L.M., Kay, K. (2022). Imagination as a fundamental function of the hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 377(1866), 20210336.
82. Conroy, S.M., Nguyen, V., Quina, L.A., Blakely-Gonzales, P., Ur, C., Netzeband, J.G., Prieto, A.L., Gruol, D.L. (2004). Interleukin-6 produces neuronal loss in developing cerebellar granule neuron cultures. *J Neuroimmunol*, 155(1-2), 43-54.
83. Corradini, I., Focchi, E., Rasile, M., Morini, R., Desiato, G., Tomasoni, R., Lizier, M., Ghirardini, E., Fesce, R., Morone, D., Barajon, I., Antonucci, F., Pozzi, D., Matteoli, M. (2018). Maternal Immune Activation Delays Excitatory-to-Inhibitory Gamma-Aminobutyric Acid Switch in Offspring. *Biol Psychiatry*, 83(8), 680-691.
84. Crampton, S.J., Collins, L.M., Toulouse, A., Nolan, Y.M., O'Keefe, G.W. (2012). Exposure of foetal neural progenitor cells to IL-1 β impairs their proliferation and alters their differentiation - a role for maternal inflammation? *J Neurochem*, 120(6), 964-973.
85. Crespi, B., Read, S., Ly, A., Hurd, P. (2019). AMBRA1, Autophagy, and the Extreme Male Brain Theory of Autism. *Autism Research and Treatment*, 2019, 1968580.
86. Curpan, A.S., Luca, A.-C., Ciobica, A. (2021). Potential Novel Therapies for Neurodevelopmental Diseases Targeting Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 6640206.
87. Czapski, G.A., Adamczyk, A., Strosznajder, R.P., Strosznajder, J.B. (2013). Expression and activity of PARP family members in the hippocampus during systemic inflammation: Their role in the regulation of prooxidative genes. *Neurochemistry International*, 62(5), 664-673.
88. Czerkies, M., Kwiatkowska, K. (2013). Receptory Toll-podobne (TLR) i ich udział we wrodzonej odpowiedzi odpornościowej na przykładzie aktywacji TLR4 przez lipopolisacharyd. *Postępy Biologii Komórki*, 40(1).
89. da Rosa, N., de Medeiros, F.D., de Oliveira, J., Laurentino, A.O.M., Peretti, E.d.M., Machado, R.S., Lourenço, M.P., da Silva, T.I., Fernandes, T.d.C., Reis, P.A., de Castro Faria Neto, H.C., Prophiro, J.S., Fortunato, J.J., Petronilho, F. (2021). 6-Shogaol Exerts a Neuroprotective Factor in Offspring after Maternal Immune Activation in Rats. *Developmental Neuroscience*, 44(1), 13-22.
90. da Rosa, N., de Medeiros, F.D., de Oliveira, J., Laurentino, A.O.M., Peretti, E.M., Machado, R.S., Fortunato, J.J., Petronilho, F. (2022). 6-Shogaol improves behavior and memory in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccharide. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 82(1), 39-49.
91. Dabbah-Assadi, F., Alon, D., Golani, I., Doron, R., Kremer, I., Beloosesky, R., Shamir, A. (2019). The influence of immune activation at early vs late gestation on fetal NRG1-ErbB4 expression and behavior in juvenile and adult mice offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 79, 207-215.
92. Dahlgren, J., Samuelsson, A.M., Jansson, T., Holmäng, A. (2006). Interleukin-6 in the maternal circulation reaches the rat fetus in mid-gestation. *Pediatr Res*, 60(2), 147-151.
93. Dai, F.-f., Hu, M., Zhang, Y.-w., Zhu, R.-h., Chen, L.-p., Li, Z.-d., Huang, Y.-j., Hu, W., Cheng, Y.-x. (2022). TNF- α /anti-TNF- α drugs and its effect on pregnancy outcomes. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 24, e26.
94. Dai, Y.C., Zhang, H.F., Schön, M., Böckers, T.M., Han, S.P., Han, J.S., Zhang, R. (2018). Neonatal Oxytocin Treatment Ameliorates Autistic-Like Behaviors and Oxytocin Deficiency in Valproic Acid-Induced Rat Model of Autism. *Front Cell Neurosci*, 12, 355.
95. Dalla Vecchia, E., Mortimer, N., Palladino, V.S., Kittel-Schneider, S., Lesch, K.P., Reif, A., Schenck, A., Norton, W.H.J. (2019). Cross-species models of attention-

- deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder: lessons from CNTNAP2, ADGRL3, and PARK2. *Psychiatr Genet*, 29(1), 1-17.
96. Dang, T., Duan, W.Y., Yu, B., Tong, D.L., Cheng, C., Zhang, Y.F., Wu, W., Ye, K., Zhang, W.X., Wu, M., Wu, B.B., An, Y., Qiu, Z.L., Wu, B.L. (2018). Autism-associated Dyrk1a truncation mutants impair neuronal dendritic and spine growth and interfere with postnatal cortical development. *Molecular Psychiatry*, 23(3), 747-758.
 97. de Camargo, R.W., da Silva, M.G., Daros, G.C., de Medeiros, F.D., da Rosa, N., Medeiros, C.L.M., de Medeiros Peretti, E., Palandi, J., Bobinski, F., Fortunato, J.J. (2021). Effects of Chronic Administration of P-Cymene in an Animal Model of LPS-Induced Autism. *Planta Medica International Open*, 8(03), e104-e113.
 98. de Souza, M.A., Szawka, R.E., Centenaro, L.A., Diehl, L.A., Lucion, A.B. (2012). Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. *Physiology & Behavior*, 105(3), 850-855.
 99. Dean, J.M., Moravec, M.D., Grafe, M., Abend, N., Ren, J., Gong, X., Volpe, J.J., Jensen, F.E., Hohimer, A.R., Back, S.A. (2011). Strain-Specific Differences in Perinatal Rodent Oligodendrocyte Lineage Progression and Its Correlation with Human. *Developmental Neuroscience*, 33(3-4), 251-260.
 100. Ding, S., Hu, Y., Luo, B., Cai, Y., Hao, K., Yang, Y., Zhang, Y., Wang, X., Ding, M., Zhang, H., Li, W., Lv, L. (2019). Age-related changes in neuroinflammation and prepulse inhibition in offspring of rats treated with Poly I:C in early gestation. *Behavioral and Brain Functions*, 15(1), 3.
 101. Doll, D.N., Hu, H., Sun, J., Lewis, S.E., Simpkins, J.W., Ren, X. (2015a). Mitochondrial Crisis in Cerebrovascular Endothelial Cells Opens the Blood–Brain Barrier. *Stroke*, 46(6), 1681-1689.
 102. Doll, D.N., Rellick, S.L., Barr, T.L., Ren, X., Simpkins, J.W. (2015b). Rapid mitochondrial dysfunction mediates TNF-alpha-induced neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 132(4), 443-451.
 103. Dominiak, A., Wilkaniec, A., Jęško, H., Czapski, G.A., Lenkiewicz, A.M., Kurek, E., Wroczyński, P., Adamczyk, A. (2017). Selol, an organic selenium donor, prevents lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat brain. *Neurochemistry International*, 108, 66-77.
 104. Dow, D., Holbrook, A., Toolan, C., McDonald, N., Sterrett, K., Rosen, N., Kim, S.H., Lord, C. (2022). The Brief Observation of Symptoms of Autism (BOSA): Development of a New Adapted Assessment Measure for Remote Telehealth Administration Through COVID-19 and Beyond. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 52(12), 5383-5394.
 105. Duchatel, R.J., Jobling, P., Graham, B.A., Harms, L.R., Michie, P.T., Hodgson, D.M., Tooney, P.A. (2016). Increased white matter neuron density in a rat model of maternal immune activation—implications for schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 65, 118-126.
 106. Duchatel, R.J., Meehan, C.L., Harms, L.R., Michie, P.T., Bigland, M.J., Smith, D.W., Walker, F.R., Jobling, P., Hodgson, D.M., Tooney, P.A. (2018). Late gestation immune activation increases IBA1-positive immunoreactivity levels in the corpus callosum of adult rat offspring. *Psychiatry Research*, 266, 175-185.
 107. Dutta, S., Sengupta, P. (2017). Defining pregnancy phases with cytokine shift. *Journal of pregnancy*, 1.
 108. Ehninger, D. (2014). *Tsc2* Haploinsufficiency Has Limited Effects on Fetal Brain Cytokine Levels during Gestational Immune Activation. *Autism Research and Treatment*, 2014, 761279.

109. Ehsani, V., Mortazavi, M., Ghorban, K., Dadmanesh, M., Bahramabadi, R., Rezayati, M.T., Javadi-Moghadam, E., Rezaei, Z., Sabzali, Z., Fatemi, I., Sheikh Fathollahi, M., Kazemi Arababadi, M. (2019). Role of maternal interleukin-8 (IL-8) in normal-term birth in the human. *Reprod Fertil Dev*, 31(6), 1049-1056.
110. Elgin, T.G., Fricke, E.M., Gong, H., Reese, J., Mills, D.A., Kalantera, K.M., Underwood, M.A., McElroy, S.J. (2019). Fetal exposure to maternal inflammation interrupts murine intestinal development and increases susceptibility to neonatal intestinal injury. *Dis Model Mech*, 12(10).
111. Elnahas, E.M., Abuelezz, S.A., Mohamad, M.I., Nabil, M.M., Abdelraouf, S.M., Bahaa, N., Hassan, G.A.M., Ibrahim, E.A., Ahmed, A.I., Aboul-Fotouh, S. (2021). Validation of prenatal versus postnatal valproic acid rat models of autism: A behavioral and neurobiological study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 108, 110185.
112. Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y.J., Kim, Y.S., Kauchali, S., Marcín, C., Montiel-Nava, C., Patel, V., Paula, C.S., Wang, C., Yasamy, M.T., Fombonne, E. (2012). Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res*, 5(3), 160-179.
113. Enstrom, A.M., Onore, C.E., Van de Water, J.A., Ashwood, P. (2010). Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*, 24(1), 64-71.
114. Equils, O., Kellogg, C., McGregor, J., Gravett, M., Neal-Perry, G., Gabay, C. (2020). The role of the IL-1 system in pregnancy and the use of IL-1 system markers to identify women at risk for pregnancy complications†. *Biol Reprod*, 103(4), 684-694.
115. Estes, M.L., McAllister, A.K. (2015). Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(8), 469-486.
116. Facucho-Oliveira, J.M., Alderson, J., Spikings, E.C., Egginton, S., St. John, J.C. (2007). Mitochondrial DNA replication during differentiation of murine embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, 120(22), 4025-4034.
117. Fan, L.W., Pang, Y. (2017). Dysregulation of neurogenesis by neuroinflammation: key differences in neurodevelopmental and neurological disorders. *Neural Regen Res*, 12(3), 366-371.
118. Farrelly, L., Föcking, M., Piontkewitz, Y., Dicker, P., English, J., Wynne, K., Cannon, M., Cagney, G., Cotter, D.R. (2015). Maternal Immune Activation Induces Changes in Myelin and Metabolic Proteins, Some of Which Can Be Prevented with Risperidone in Adolescence. *Developmental Neuroscience*, 37(1), 43-55.
119. Fernández de Cossío, L., Guzmán, A., van der Veldt, S., Luheshi, G.N. (2017). Prenatal infection leads to ASD-like behavior and altered synaptic pruning in the mouse offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 63, 88-98.
120. Fetit, R., Hillary, R.F., Price, D.J., Lawrie, S.M. (2021). The neuropathology of autism: A systematic review of post-mortem studies of autism and related disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 129, 35-62.
121. Foley, K.A., MacFabe, D.F., Vaz, A., Ossenkopp, K.-P., Kavaliers, M. (2014). Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to propionic acid and lipopolysaccharide on social behavior in neonatal, adolescent, and adult rats: Implications for autism spectrum disorders. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 39, 68-78.
122. Frank, M., Duvezin-Caubet, S., Koob, S., Occhipinti, A., Jagasia, R., Petcherski, A., Ruonala, M.O., Priault, M., Salin, B., Reichert, A.S. (2012). Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(12), 2297-2310.

123. Fricke, E.M., Elgin, T.G., Gong, H., Reese, J., Gibson-Corley, K.N., Weiss, R.M., Zimmerman, K., Bowdler, N.C., Kalantera, K.M., Mills, D.A., Underwood, M.A., McElroy, S.J. (2018). Lipopolysaccharide-induced maternal inflammation induces direct placental injury without alteration in placental blood flow and induces a secondary fetal intestinal injury that persists into adulthood. *Am J Reprod Immunol*, 79(5), e12816.
124. Frye, R.E. (2020). Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder: Unique Abnormalities and Targeted Treatments. *Seminars in Pediatric Neurology*, 35, 100829.
125. Fuhler, G.M. (2020). The immune system and microbiome in pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 44-45, 101671.
126. Fujita, Y., Ishima, T., Hashimoto, K. (2016). Supplementation with D-serine prevents the onset of cognitive deficits in adult offspring after maternal immune activation. *Scientific Reports*, 6(1), 37261.
127. Fyke, W., Velinov, M. (2021). FMR1 and Autism, an Intriguing Connection Revisited. *Genes*, 12(8), 1218.
128. Gao, F., Reynolds, M.B., Passalacqua, K.D., Sexton, J.Z., Abuaita, B.H., O’Riordan, M.X.D. (2021). The Mitochondrial Fission Regulator DRP1 Controls Post-Transcriptional Regulation of TNF- α . *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10.
129. Gao, H.-M., Zhou, H., Hong, J.-S. (2012). NADPH oxidases: novel therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(6), 295-303.
130. Gao, R., Penzes, P. (2015). Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Curr Mol Med*, 15(2), 146-167.
131. Garay, P.A., Hsiao, E.Y., Patterson, P.H., McAllister, A.K. (2013). Maternal immune activation causes age- and region-specific changes in brain cytokines in offspring throughout development. *Brain, Behavior, and Immunity*, 31, 54-68.
132. Gatica, D., Lahiri, V., Klionsky, D.J. (2018). Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nature Cell Biology*, 20(3), 233-242.
133. Gayle, D.A., Beloosesky, R., Desai, M., Amidi, F., Nuñez, S.E., Ross, M.G. (2004). Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(6), R1024-R1029.
134. Gąssowska-Dobrowolska, M., Cieślík, M., Czapski, G.A., Jęsko, H., Frontczak-Baniewicz, M., Gewartowska, M., Dominiak, A., Polowy, R., Filipkowski, R.K., Babiec, L., Adamczyk, A. (2020). Prenatal Exposure to Valproic Acid Affects Microglia and Synaptic Ultrastructure in a Brain-Region-Specific Manner in Young-Adult Male Rats: Relevance to Autism Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci*, 21(10).
135. Ge, Y., Shi, X., Boopathy, S., McDonald, J., Smith, A.W., Chao, L.H. (2020). Two forms of Opal cooperate to complete fusion of the mitochondrial inner-membrane. *Elife*, 9.
136. Gentile, S. (2014). Risks of neurobehavioral teratogenicity associated with prenatal exposure to valproate monotherapy: a systematic review with regulatory repercussions. *CNS Spectr*, 19(4), 305-315.
137. Gilmore, J.H., Jarskog, L.F., Vadlamudi, S. (2005). Maternal poly I:C exposure during pregnancy regulates TNF α , BDNF, and NGF expression in neonatal brain and the maternal–fetal unit of the rat. *Journal of Neuroimmunology*, 159(1), 106-112.

138. Giovanoli, S., Notter, T., Richetto, J., Labouesse, M.A., Vuillermot, S., Riva, M.A., Meyer, U. (2015). Late prenatal immune activation causes hippocampal deficits in the absence of persistent inflammation across aging. *J Neuroinflammation*, 12, 221.
139. Giovanoli, S., Weber-Stadlbauer, U., Schedlowski, M., Meyer, U., Engler, H. (2016). Prenatal immune activation causes hippocampal synaptic deficits in the absence of overt microglia anomalies. *Brain Behav Immun*, 55, 25-38.
140. Girard, S., Tremblay, L., Lepage, M., Sébire, G. (2010). IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *J Immunol*, 184(7), 3997-4005.
141. Giulivi, C., Napoli, E., Schwartz, J., Careaga, M., Ashwood, P. (2013). Gestational Exposure to a Viral Mimetic Poly(I:C) Results in Long-Lasting Changes in Mitochondrial Function by Leucocytes in the Adult Offspring. *Mediators of Inflammation*, 2013, 609602.
142. Goines, P.E., Croen, L.A., Braunschweig, D., Yoshida, C.K., Grether, J., Hansen, R., Kharrazi, M., Ashwood, P., Van de Water, J. (2011). Increased midgestational IFN- γ , IL-4 and IL-5 in women bearing a child with autism: A case-control study. *Molecular Autism*, 2(1), 13.
143. González-Cano, S.I., Camacho-Abrego, I., Diaz, A., de la Cruz, F., Morales-Medina, J.C., Flores, G. (2021). Prenatal exposure to propionic acid induces altered locomotion and reactive astrogliosis in male rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 117, 102011.
144. Grazioli, S., Pugin, J. (2018). Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns: From Inflammatory Signaling to Human Diseases. *Front Immunol*, 9, 832.
145. Greenhill, C.J., Rose-John, S., Lissilaa, R., Ferlin, W., Ernst, M., Hertzog, P.J., Mansell, A., Jenkins, B.J. (2011). IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3. *J Immunol*, 186(2), 1199-1208.
146. Griffith, O.W., Chavan, A.R., Protopapas, S., Maziarz, J., Romero, R., Wagner, G.P. (2017). Embryo implantation evolved from an ancestral inflammatory attachment reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(32), E6566-e6575.
147. Groen, W., Teluij, M., Buitelaar, J., Tendolkar, I. (2010). Amygdala and hippocampus enlargement during adolescence in autism. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 49(6), 552-560.
148. Gu, F., Chauhan, V., Kaur, K., Brown, W.T., LaFauci, G., Wegiel, J., Chauhan, A. (2013). Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism. *Translational Psychiatry*, 3(9), e299-e299.
149. Gumusoglu, S.B., Fine, R.S., Murray, S.J., Bittle, J.L., Stevens, H.E. (2017). The role of IL-6 in neurodevelopment after prenatal stress. *Brain Behav Immun*, 65, 274-283.
150. Gzielo, K., Nikiforuk, A. (2021). Astroglia in Autism Spectrum Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11544.
151. Haddad, F.L., De Oliveira, C., Schmid, S. (2023). Investigating behavioral phenotypes related to autism spectrum disorder in a gene-environment interaction model of Cntnap2 deficiency and Poly I:C maternal immune activation. *Front Neurosci*, 17, 1160243.
152. Han, V.X., Patel, S., Jones, H.F., Dale, R.C. (2021). Maternal immune activation and neuroinflammation in human neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews Neurology*, 17(9), 564-579.
153. Hegazy, H.G., Ali, E.H.A., Elgoly, A.H.M. (2015). Interplay between pro-inflammatory cytokines and brain oxidative stress biomarkers: Evidence of parallels between butyl paraben intoxication and the valproic acid brain physiopathology in autism rat model. *Cytokine*, 71(2), 173-180.

154. Herrera-Muñoz, A., Fernández-Alonso, A.M., Fischer-Suárez, N., Chedraui, P., Pérez-López, F.R. (2017). Maternal serum cytokine levels in pregnancies complicated with threatened preterm labour. *Gynecological Endocrinology*, 33(5), 408-412.
155. Heuer, L.S., Croen, L.A., Jones, K.L., Yoshida, C.K., Hansen, R.L., Yolken, R., Zerbo, O., DeLorenze, G., Kharrazi, M., Ashwood, P., Van de Water, J. (2019). An Exploratory Examination of Neonatal Cytokines and Chemokines as Predictors of Autism Risk: The Early Markers for Autism Study. *Biological Psychiatry*, 86(4), 255-264.
156. Hodges, H., Fealko, C., Soares, N. (2020). Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. *Transl Pediatr*, 9(Suppl 1), S55-s65.
157. Holsapple, M.P., West, L.J., Landreth, K.S. (2003). Species comparison of anatomical and functional immune system development. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 68(4), 321-334.
158. Hrabovska, S.V., Salyha, Y.T. (2016). Animal Models of Autism Spectrum Disorders and Behavioral Techniques of their Examination. *Neurophysiology*, 48(5), 380-388.
159. Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Chow, J., Mazmanian, S.K., Patterson, P.H. (2012). Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(31), 12776-12781.
160. Hsiao, E.Y., Patterson, P.H. (2011). Activation of the maternal immune system induces endocrine changes in the placenta via IL-6. *Brain Behav Immun*, 25(4), 604-615.
161. Huang, X., Hussain, B., Chang, J. (2021). Peripheral inflammation and blood-brain barrier disruption: effects and mechanisms. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 27(1), 36-47.
162. Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293.
163. Ikon, N., Ryan, R.O. (2017). Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(6), 1156-1163.
164. Ikonomidou, C., Kaindl, A.M. (2011). Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. *Antioxid Redox Signal*, 14(8), 1535-1550.
165. Iskusnykh, I.Y., Zakharova, A.A., Pathak, D. (2022). Glutathione in Brain Disorders and Aging. *Molecules*, 27(1), 324.
166. Jach-Salamon, N. (2022). Autyzm jako wyzwanie w wymiarze medycznym, diagnostycznym i terapeutycznym. *Journal of Education, Health and Sport*, 12(1), 172-191.
167. Jamwal, S., Blackburn, J.K., Elsworth, J.D. (2021). PPAR γ /PGC1 α signaling as a potential therapeutic target for mitochondrial biogenesis in neurodegenerative disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 219, 107705.
168. Jankord, R., Solomon, M.B., Albrecht, J., Flak, J.N., Zhang, R., Herman, J.P. (2011). Stress Vulnerability during Adolescent Development in Rats. *Endocrinology*, 152(2), 629-638.
169. Jastrzębowska, G. (2020). Zaburzenia neurorozwojowe. Zmiany w podejściu teoretycznym i diagnostycznym. *Logopedia*, 48(1), 27-45.
170. Javadov, S., Chapa-Dubocq, X., Makarov, V. (2018). Different approaches to modeling analysis of mitochondrial swelling. *Mitochondrion*, 38, 58-70.
171. Jiang, H.Y., Xu, L.L., Shao, L., Xia, R.M., Yu, Z.H., Ling, Z.X., Yang, F., Deng, M., Ruan, B. (2016). Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*, 58, 165-172.
172. Jiang, N.M., Cowan, M., Moonah, S.N., Petri, W.A., Jr. (2018). The Impact of Systemic Inflammation on Neurodevelopment. *Trends Mol Med*, 24(9), 794-804.

173. Jin, W., Dong, C. (2013). IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect*, 2(9), e60.
174. Jones, D.P. (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol*, 348, 93-112.
175. Jornayvaz, F.R., Shulman, G.I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*, 47, 69-84.
176. Jovanovic, D.V., Di Battista, J.A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F.C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., Pelletier, J.P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*, 160(7), 3513-3521.
177. Juric-Sekhar, G., Hevner, R.F. (2019). Malformations of Cerebral Cortex Development: Molecules and Mechanisms. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14(1), 293-318.
178. Kang, I., Chu, C.T., Kaufman, B.A. (2018). The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: emerging evidence and mechanisms. *FEBS Letters*, 592(5), 793-811.
179. Kasprowska-Liśkiewicz, D. (2017). Komórka na granicy życia i śmierci, czyli oddziaływania między procesami autofagii i apoptozy. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 71, 825-841.
180. Kawalec, M., Beręsewicz, M., Zabłocki, K., Zabłocka, B. (2016). Mitofuzyna 2 i dynamika mitochondriów w normie i patologii. *Postępy Biochemii*, 62(2), 149-157.
181. Khacho, M., Clark, A., Svoboda, Devon S., Azzi, J., MacLaurin, Jason G., Meghaizel, C., Sesaki, H., Lagace, Diane C., Germain, M., Harper, M.-E., Park, David S., Slack, Ruth S. (2016). Mitochondrial Dynamics Impacts Stem Cell Identity and Fate Decisions by Regulating a Nuclear Transcriptional Program. *Cell Stem Cell*, 19(2), 232-247.
182. Khacho, M., Slack, R.S. (2018). Mitochondrial dynamics in the regulation of neurogenesis: From development to the adult brain. *Developmental Dynamics*, 247(1), 47-53.
183. Kierdorf, K., Prinz, M. (2013). Factors regulating microglia activation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7.
184. Killackey, S.A., Philpott, D.J., Girardin, S.E. (2020). Mitophagy pathways in health and disease. *Journal of Cell Biology*, 219(11).
185. Kirsten, T.B., Bernardi, M.M. (2017). Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: Repetitive self-grooming and stereotypies. *Behavioural Brain Research*, 331, 25-29.
186. Kirsten, T.B., Chaves-Kirsten, G.P., Chaible, L.M., Silva, A.C., Martins, D.O., Britto, L.R.G., Dagli, M.L.Z., Torrão, A.S., Palermo-Neto, J., Bernardi, M.M. (2012). Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroscience Research*, 90(10), 1903-1912.
187. Kirsten, T.B., Chaves, G.P., Taricano, M., Martins, D.O., Flório, J.C., de Britto, L.R.G., Torrão, A.d.S., Palermo-Neto, J., Bernardi, M.M. (2011). Prenatal LPS exposure reduces olfactory perception in neonatal and adult rats. *Physiology & Behavior*, 104(3), 417-422.
188. Kirsten, T.B., Lippi, L.L., Bevilacqua, E., Bernardi, M.M. (2013). LPS Exposure Increases Maternal Corticosterone Levels, Causes Placental Injury and Increases IL-1B Levels in Adult Rat Offspring: Relevance to Autism. *PLoS One*, 8(12), e82244.
189. Kirsten, T.B., Queiroz-Hazarbassanov, N., Bernardi, M.M., Felicio, L.F. (2015). Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in a rat

- model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure. *Life Sciences*, 130, 12-17.
190. Kirsten, T.B., Taricano, M., Flório, J.C., Palermo-Neto, J., Bernardi, M.M. (2010). Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring. *Behavioural Brain Research*, 211(1), 77-82.
 191. Ko, A.R., Hyun, H.W., Min, S.J., Kim, J.E. (2016). The Differential DRP1 Phosphorylation and Mitochondrial Dynamics in the Regional Specific Astroglial Death Induced by Status Epilepticus. *Front Cell Neurosci*, 10, 124.
 192. Kocharński, A., Kabzińska, D., Rzepnikowska, W., Binięda, K., Kiepusa, A. (2018). Perspektywy terapii w polineuropatiach genetycznie uwarunkowanych. *Postępy Biochemii*, 64(4), 288-299.
 193. Kolb, B., Gibb, R. (2015). Plasticity in the prefrontal cortex of adult rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9.
 194. Kongsman, J.P. (2022). Cytokines in the Brain and Neuroinflammation: We Didn't Starve the Fire! *Pharmaceuticals*, 15(2), 140.
 195. Koss-Mikołajczyk, I., Baranowska, M., Namieśnik, J., Bartoszek, A. (2017). Determination of antioxidant activity of phytochemicals in cellular models by fluorescence/luminescence methods. *Postępy Hig Med Dosw (Online)*, 71(0), 602-617.
 196. Kovac, S., Angelova, P.R., Holmström, K.M., Zhang, Y., Dinkova-Kostova, A.T., Abramov, A.Y. (2015). Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(4), 794-801.
 197. Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 32, 149-184.
 198. Kruth, K.A., Grisolano, T.M., Ahern, C.A., Williams, A.J. (2020). SCN2A channelopathies in the autism spectrum of neuropsychiatric disorders: a role for pluripotent stem cells? *Mol Autism*, 11(1), 23.
 199. Kwong, Jennifer Q., Molkentin, Jeffery D. (2015). Physiological and Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart. *Cell Metabolism*, 21(2), 206-214.
 200. Lam, J., Sutton, P., Kalkbrenner, A., Windham, G., Halladay, A., Koustas, E., Lawler, C., Davidson, L., Daniels, N., Newschaffer, C., Woodruff, T. (2016). A Systematic Review and Meta-Analysis of Multiple Airborne Pollutants and Autism Spectrum Disorder. *PLoS One*, 11(9), e0161851.
 201. Lanté, F., Meunier, J., Guiramand, J., Maurice, T., Cavalier, M., de Jesus Ferreira, M.-C., Aimar, R., Cohen-Solal, C., Vignes, M., Barbanel, G. (2007). Neurodevelopmental damage after prenatal infection: Role of oxidative stress in the fetal brain. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(8), 1231-1245.
 202. Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C.N., Nielsen, L.B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H.D., Boushel, R., Helge, J.W., Dela, F. (2012). Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *The Journal of physiology*, 590(14), 3349-3360.
 203. Laurindo, F.R., Araujo, T.L., Abrahão, T.B. (2014). Nox NADPH oxidases and the endoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal*, 20(17), 2755-2775.
 204. Le Belle, J.E., Sperry, J., Ngo, A., Ghojani, Y., Laks, D.R., López-Aranda, M., Silva, A.J., Kornblum, H.I. (2014). Maternal inflammation contributes to brain overgrowth and autism-associated behaviors through altered redox signaling in stem and progenitor cells. *Stem Cell Reports*, 3(5), 725-734.
 205. Le Duc, D., Giulivi, C., Hiatt, S.M., Napoli, E., Panoutsopoulos, A., Harlan De Crescenzo, A., Kotzaeridou, U., Syrbe, S., Anagnostou, E., Azage, M., Bend, R.,

- Begtrup, A., Brown, N.J., Büttner, B., Cho, M.T., Cooper, G.M., Doering, J.H., Dubourg, C., Everman, D.B., Hildebrand, M.S., Santos, F.J.R., Kellam, B., Keller-Ramey, J., Lemke, J.R., Liu, S., Niyazov, D., Payne, K., Person, R., Quélin, C., Schnur, R.E., Smith, B.T., Strober, J., Walker, S., Wallis, M., Walsh, L., Yang, S., Yuen, R.K.C., Ziegler, A., Sticht, H., Pride, M.C., Orosco, L., Martínez-Cerdeño, V., Silverman, J.L., Crawley, J.N., Scherer, S.W., Zarbalis, K.S., Jamra, R. (2019). Pathogenic WDFY3 variants cause neurodevelopmental disorders and opposing effects on brain size. *Brain*, *142*(9), 2617-2630.
206. Lee, G.A., Lin, Y.-K., Lai, J.-H., Lo, Y.-C., Yang, Y.-C.S.H., Ye, S.-Y., Lee, C.-J., Wang, C.-C., Chiang, Y.-H., Tseng, S.-H. (2021). Maternal Immune Activation Causes Social Behavior Deficits and Hypomyelination in Male Rat Offspring with an Autism-Like Microbiota Profile. *Brain Sciences*, *11*(8), 1085.
207. Lee, H., Jose, P.A. (2021). Coordinated Contribution of NADPH Oxidase- and Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species in Metabolic Syndrome and Its Implication in Renal Dysfunction. *Frontiers in Pharmacology*, *12*.
208. Leyfer, O.T., Folstein, S.E., Bacalman, S., Davis, N.O., Dinh, E., Morgan, J., Tager-Flusberg, H., Lainhart, J.E. (2006). Comorbid Psychiatric Disorders in Children with Autism: Interview Development and Rates of Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *36*(7), 849-861.
209. Li, P.A., Hou, X., Hao, S. (2017). Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration. *J Neurosci Res*, *95*(10), 2025-2029.
210. Li, W.Y., Chang, Y.C., Lee, L.J., Lee, L.J. (2014). Prenatal infection affects the neuronal architecture and cognitive function in adult mice. *Dev Neurosci*, *36*(5), 359-370.
211. Liang, X., Liu, Y., Chen, L., Chen, S. (2021). The natural compound puerarin alleviates inflammation and apoptosis in experimental cell and rat preeclampsia models. *International Immunopharmacology*, *99*, 108001.
212. Lin-Hendel, Erika G., McManus, Meagan J., Wallace, Douglas C., Anderson, Stewart A., Golden, Jeffrey A. (2016). Differential Mitochondrial Requirements for Radially and Non-radially Migrating Cortical Neurons: Implications for Mitochondrial Disorders. *Cell Reports*, *15*(2), 229-237.
213. Lin, Y., Yerukala Sathipati, S., Ho, S.Y. (2021). Predicting the Risk Genes of Autism Spectrum Disorders. *Front Genet*, *12*, 665469.
214. Linker, S.B., Mendes, A.P.D., Marchetto, M.C. (2020). IGF-1 treatment causes unique transcriptional response in neurons from individuals with idiopathic autism. *Mol Autism*, *11*(1), 55.
215. Lipkind, D., Sakov, A., Kafkafi, N., Elmer, G.I., Benjamini, Y., Golani, I. (2004). New replicable anxiety-related measures of wall vs. center behavior of mice in the open field. *Journal of Applied Physiology*, *97*(1), 347-359.
216. Liu, E., Lewis, K., Al-Saffar, H., Krall, C.M., Singh, A., Kulchitsky, V.A., Corrigan, J.J., Simons, C.T., Petersen, S.R., Musteata, F.M., Bakshi, C.S., Romanovsky, A.A., Sellati, T.J., Steiner, A.A. (2012). Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and Escherichia coli-induced systemic inflammation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *302*(12), R1372-1383.
217. Liu, J., Dong, P., Jia, N., Wen, X., Luo, L., Wang, S., Li, J. (2022a). The expression of intracellular cytokines of decidual natural killer cells in unexplained recurrent pregnancy loss. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, *35*(16), 3209-3215.

218. Liu, T., Li, C.Y., Chen, H., Liu, J., Zhong, L.L., Tang, M.M., Wang, W.B., Huang, J.P., Jiang, X.S. (2022b). tBHQ attenuates podocyte injury in diabetic nephropathy by inhibiting NADPH oxidase-derived ROS generation via the Nrf2/HO-1 signalling pathway. *Heliyon*, 8(9), e10515.
219. Liu, Y., Beyer, A., Aebersold, R. (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*, 165(3), 535-550.
220. Loayza, M., Lin, S., Carter, K., Ojeda, N., Fan, L.W., Ramarao, S., Bhatt, A., Pang, Y. (2022). Maternal immune activation alters fetal and neonatal microglia phenotype and disrupts neurogenesis in mice. *Pediatr Res*.
221. Lobzhanidze, G., Japaridze, N., Lordkipanidze, T., Rzyayev, F., MacFabe, D., Zhvania, M. (2020). Behavioural and brain ultrastructural changes following the systemic administration of propionic acid in adolescent male rats. Further development of a rodent model of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 80(2), 139-156.
222. Lord, C., Brugha, T.S., Charman, T., Cusack, J., Dumas, G., Frazier, T., Jones, E.J.H., Jones, R.M., Pickles, A., State, M.W., Taylor, J.L., Veenstra-VanderWeele, J. (2020). Autism spectrum disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), 5.
223. Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *Lancet*, 392(10146), 508-520.
224. Lou, G., Palikaras, K., Lautrup, S., Scheibye-Knudsen, M., Tavernarakis, N., Fang, E.F. (2020). Mitophagy and Neuroprotection. *Trends in Molecular Medicine*, 26(1), 8-20.
225. Lyall, K., Croen, L., Daniels, J., Fallin, M.D., Ladd-Acosta, C., Lee, B.K., Park, B.Y., Snyder, N.W., Schendel, D., Volk, H., Windham, G.C., Newschaffer, C. (2017). The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annu Rev Public Health*, 38, 81-102.
226. Łoza, B. (2018). Dlaczego kwas walproinowy stał się najczęściej stosowanym stabilizatorem nastroju? *Neuropsychiatria. Przegląd kliniczny*, 10(1), 28-37.
227. Macura, B., Śliwa, L. (2015). Zjawisko epigenetyki w łożysku, aktualny stan wiedzy i perspektywy zastosowania w praktyce klinicznej. *Przegląd Lekarski*, 72(11).
228. Maenner, M.J., Shaw, K.A., Baio, J., Washington, A., Patrick, M., DiRienzo, M., Christensen, D.L., Wiggins, L.D., Pettygrove, S., Andrews, J.G., Lopez, M., Hudson, A., Baroud, T., Schwenk, Y., White, T., Rosenberg, C.R., Lee, L.C., Harrington, R.A., Huston, M., Hewitt, A., Esler, A., Hall-Lande, J., Poynter, J.N., Hallas-Muchow, L., Constantino, J.N., Fitzgerald, R.T., Zahorodny, W., Shenouda, J., Daniels, J.L., Warren, Z., Vehorn, A., Salinas, A., Durkin, M.S., Dietz, P.M. (2020). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. *MMWR Surveill Summ*, 69(4), 1-12.
229. Malec-Milewska, M. (2015). Leczenie bólu u chorych w wieku podeszłym. *Postępy Nauk Med*, 28, 489-497.
230. Malkova, N.V., Yu, C.Z., Hsiao, E.Y., Moore, M.J., Patterson, P.H. (2012). Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(4), 607-616.
231. Manivasagam, T., Arunadevi, S., Essa, M.M., SaravanaBabu, C., Borah, A., Thenmozhi, A.J., Qoronfleh, M.W. (2020). Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Autism. *Adv Neurobiol*, 24, 193-206.
232. Márquez-Roperó, M., Benito, E., Plaza-Zabala, A., Sierra, A. (2020). Microglial corpse clearance: lessons from macrophages. *Frontiers in Immunology*, 11, 506.

233. Masini, E., Loi, E., Vega-Benedetti, A.F., Carta, M., Doneddu, G., Fadda, R., Zavattari, P. (2020). An Overview of the Main Genetic, Epigenetic and Environmental Factors Involved in Autism Spectrum Disorder Focusing on Synaptic Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8290.
234. Mawson, A.R., Croft, A.M. (2019). Rubella Virus Infection, the Congenital Rubella Syndrome, and the Link to Autism. *Int J Environ Res Public Health*, 16(19).
235. McPhillips, M., Finlay, J., Bejerot, S., Hanley, M. (2014). Motor Deficits in Children With Autism Spectrum Disorder: A Cross-Syndrome Study. *Autism Research*, 7(6), 664-676.
236. Meyer, U., Nyffeler, M., Yee, B.K., Knuesel, I., Feldon, J. (2008). Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain Behav Immun*, 22(4), 469-486.
237. Meyer, U., Yee, B.K., Feldon, J. (2007). The Neurodevelopmental Impact of Prenatal Infections at Different Times of Pregnancy: The Earlier the Worse? *The Neuroscientist*, 13(3), 241-256.
238. Miller, K.N., Clark, J.P., Anderson, R.M. (2019). Mitochondrial regulator PGC-1 α -Modulating the modulator. *Curr Opin Endocr Metab Res*, 5, 37-44.
239. Miller, M.T., Strömland, K., Ventura, L., Johansson, M., Bandim, J.M., Gillberg, C. (2004). Autism with ophthalmologic malformations: the plot thickens. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 102, 107-120; discussion 120-101.
240. Minghetti, L. (2004). Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63(9), 901-910.
241. Molnár, Z., Clowry, G.J., Šestan, N., Alzu'bi, A., Bakken, T., Hevner, R.F., Hüppi, P.S., Kostović, I., Rakic, P., Anton, E.S., Edwards, D., Garcez, P., Hoerder-Suabedissen, A., Kriegstein, A. (2019). New insights into the development of the human cerebral cortex. *Journal of Anatomy*, 235(3), 432-451.
242. Mondelli, V., Vernon, A.C., Turkheimer, F., Dazzan, P., Pariante, C.M. (2017). Brain microglia in psychiatric disorders. *The Lancet Psychiatry*, 4(7), 563-572.
243. Monteiro, B.S., Freire-Brito, L., Carrageta, D.F., Oliveira, P.F., Alves, M.G. (2021). Mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) as Key Modulators of ROS Homeostasis: A Crosstalk between Diabetes and Male Infertility? *Antioxidants*, 10(11), 1746.
244. Monzón-Bordonaba, F., Vadillo-Ortega, F., Feinberg, R.F. (2002). Modulation of trophoblast function by tumor necrosis factor- α : A role in pregnancy establishment and maintenance? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 187(6), 1574-1580.
245. Mor, G., Cardenas, I., Abrahams, V., Guller, S. (2011). Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci*, 1221(1), 80-87.
246. Morgan, J.T., Chana, G., Pardo, C.A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Courchesne, E., Everall, I.P. (2010). Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol Psychiatry*, 68(4), 368-376.
247. Mossa, A., Pagano, J., Ponzoni, L., Tozzi, A., Vezzoli, E., Sciacaluga, M., Costa, C., Beretta, S., Francolini, M., Sala, M., Calabresi, P., Boeckers, T.M., Sala, C., Verpelli, C. (2021). Developmental impaired Akt signaling in the Shank1 and Shank3 double knock-out mice. *Molecular Psychiatry*, 26(6), 1928-1944.
248. Mottahedin, A., Ardalan, M., Chumak, T., Riebe, I., Ek, J., Mallard, C. (2017). Effect of Neuroinflammation on Synaptic Organization and Function in the Developing Brain: Implications for Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11.

249. Mouihate, A. (2016). Prenatal Activation of Toll-Like Receptor-4 Dampens Adult Hippocampal Neurogenesis in An IL-6 Dependent Manner. *Front Cell Neurosci*, 10, 173.
250. Mousa, A., Bakhiet, M. (2013). Role of Cytokine Signaling during Nervous System Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 13931-13957.
251. Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417(1), 1-13.
252. Murphy, S.P., Tayade, C., Ashkar, A.A., Hatta, K., Zhang, J., Croy, B.A. (2009). Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol Reprod*, 80(5), 848-859.
253. Murray, B.G., Davies, D.A., Molder, J.J., Howland, J.G. (2017). Maternal immune activation during pregnancy in rats impairs working memory capacity of the offspring. *Neurobiology of Learning and Memory*, 141, 150-156.
254. Nadeem, A., Ahmad, S.F., Attia, S.M., Al-Ayadhi, L.Y., Bakheet, S.A., Al-Harbi, N.O. (2019). Oxidative and inflammatory mediators are upregulated in neutrophils of autistic children: Role of IL-17A receptor signaling. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 90, 204-211.
255. Nadeem, A., Ahmad, S.F., Bakheet, S.A., Al-Harbi, N.O., Al-Ayadhi, L.Y., Attia, S.M., Zoheir, K.M.A. (2017). Toll-like receptor 4 signaling is associated with upregulated NADPH oxidase expression in peripheral T cells of children with autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 61, 146-154.
256. Nair, S., Sobotka, K.S., Joshi, P., Gressens, P., Fleiss, B., Thornton, C., Mallard, C., Hagberg, H. (2019). Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response in vitro and in vivo. *Glia*, 67(6), 1047-1061.
257. Napoli, E., Song, G., Panoutsopoulos, A., Riyadh, M.A., Kaushik, G., Halmai, J., Levenson, R., Zarbali, K.S., Giulivi, C. (2018). Beyond autophagy: a novel role for autism-linked Wdfy3 in brain mitophagy. *Scientific Reports*, 8(1), 11348.
258. Naviaux, R.K., Zolkipli, Z., Wang, L., Nakayama, T., Naviaux, J.C., Le, T.P., Schuchbauer, M.A., Rogac, M., Tang, Q., Dugan, L.L., Powell, S.B. (2013). Antipurinergic Therapy Corrects the Autism-Like Features in the Poly(IC) Mouse Model. *PLoS One*, 8(3), e57380.
259. Nayernia, Z., Jaquet, V., Krause, K.H. (2014). New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal*, 20(17), 2815-2837.
260. Niu, M., Han, Y., Dy, A.B.C., Du, J., Jin, H., Qin, J., Zhang, J., Li, Q., Hagerman, R.J. (2017). Autism Symptoms in Fragile X Syndrome. *Journal of Child Neurology*, 32(10), 903-909.
261. O'Loughlin, E., Pakan, J.M.P., Yilmazer-Hanke, D., McDermott, K.W. (2017). Acute in utero exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre- and postnatal brain and alters the glial cytoarchitecture in the developing amygdala. *J Neuroinflammation*, 14(1), 212.
262. O'Loughlin, E., Pakan, J.M.P., Yilmazer-Hanke, D., McDermott, K.W. (2017). Acute in utero exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre- and postnatal brain and alters the glial cytoarchitecture in the developing amygdala. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 212.
263. Ochoa-Bernal, M.A., Fazleabas, A.T. (2020). Physiologic Events of Embryo Implantation and Decidualization in Human and Non-Human Primates. *Int J Mol Sci*, 21(6).
264. Oh, J., Fleming, A.M., Xu, J., Chong, J., Burrows, C.J., Wang, D. (2020). RNA polymerase II stalls on oxidative DNA damage via a torsion-latch mechanism involving

- lone pair- π and CH- π interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(17), 9338-9348.
265. Oliveira, J.M.A. (2012). Mitochondrial Membrane Potential and Dynamics. In A.K. Reeve, K.J. Krishnan, M.R. Duchen, D.M. Turnbull (Eds.), *Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Disorders*, Springer London, London, pp. 127-139.
 266. Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO Journal*, 40(3), e104705.
 267. Ornoy, A., Weinstein- Fudim, L., Ergaz, Z. (2016). Genetic Syndromes, Maternal Diseases and Antenatal Factors Associated with Autism Spectrum Disorders (ASD). *Frontiers in Neuroscience*, 10.
 268. Oskvig, D.B., Elkahlon, A.G., Johnson, K.R., Phillips, T.M., Herkenham, M. (2012). Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(4), 623-634.
 269. Otera, H., Ishihara, N., Mihara, K. (2013). New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(5), 1256-1268.
 270. Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913-922.
 271. Ozaki, K., Kato, D., Ikegami, A., Hashimoto, A., Sugio, S., Guo, Z., Shibushita, M., Tatematsu, T., Haruwaka, K., Moorhouse, A.J., Yamada, H., Wake, H. (2020). Maternal immune activation induces sustained changes in fetal microglia motility. *Sci Rep*, 10(1), 21378.
 272. Panesar, H.K., Kennedy, C.L., Keil Stietz, K.P., Lein, P.J. (2020). Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Risk Factors for Autism Spectrum Disorder? *Toxics*, 8(3), 70.
 273. Pangrazzi, L., Balasco, L., Bozzi, Y. (2020). Oxidative Stress and Immune System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3293.
 274. Papa, S., Martino, P.L., Capitanio, G., Gaballo, A., De Rasmio, D., Signorile, A., Petruzzella, V. (2012). The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria. In R. Scatena, P. Bottoni, B. Giardina (Eds.), *Advances in Mitochondrial Medicine*, Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 3-37.
 275. Park, J., Min, J.-S., Kim, B., Chae, U.-B., Yun, J.W., Choi, M.-S., Kong, I.-K., Chang, K.-T., Lee, D.-S. (2015). Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- κ B pathways. *Neuroscience Letters*, 584, 191-196.
 276. Parker-Athill, E.C., Tan, J. (2010). Maternal immune activation and autism spectrum disorder: interleukin-6 signaling as a key mechanistic pathway. *Neurosignals*, 18(2), 113-128.
 277. Parker, G.A., Picut, C.A., Swanson, C., Toot, J.D. (2015). Histologic Features of Postnatal Development of Immune System Organs in the Sprague-Dawley Rat. *Toxicol Pathol*, 43(6), 794-815.
 278. Partyka, M., Duszyński, J., Szczepanowska, J. (2016). Zmiany dynamiki mitochondriów w odpowiedzi na stres mitochondrialny w modelach sporadycznej formy Choroby Parkinsona. *Postępy Biochemii*, 62(2), 173-181.
 279. Pawlak, A., Gewartowska, M., Przybylski, M., Kuffner, M., Wiligórska, D., Gil, R., Król, Z., Frontczak-Baniewicz, M. (2022). Ultrastructural Changes in Mitochondria in

- Patients with Dilated Cardiomyopathy and Parvovirus B19 Detected in Heart Tissue without Myocarditis. *Journal of Personalized Medicine*, 12(2), 177.
280. Pawlicka-Kaczorowska, J., Czaczyk, K. (2016). Klasyczne bakterie propionowe–taksonomia, warunki hodowlane oraz zastosowanie. *Post Mikrobiol*, 55, 367-380.
 281. Pecorelli, A., Ferrara, F., Messano, N., Cordone, V., Schiavone, M.L., Cervellati, F., Woodby, B., Cervellati, C., Hayek, J., Valacchi, G. (2020). Alterations of mitochondrial bioenergetics, dynamics, and morphology support the theory of oxidative damage involvement in autism spectrum disorder. *The FASEB Journal*, 34(5), 6521-6538.
 282. Pendyala, G., Chou, S., Jung, Y., Coiro, P., Spartz, E., Padmashri, R., Li, M., Dunaevsky, A. (2017). Maternal immune activation causes behavioral impairments and altered cerebellar cytokine and synaptic protein expression. *Neuropsychopharmacology*, 42(7), 1435-1446.
 283. Perez-Fernandez, C., Matamala Montoya, M., Morales-Navas, M., Guardia-Escote, L., Cabré, M., Colomina, M.T., Giménez, E., Sánchez-Santed, F. (2022). Influence of Gestational Chlorpyrifos Exposure on ASD-like Behaviors in an *fmr1*-KO Rat Model. *Molecular Neurobiology*, 59(9), 5835-5855.
 284. Perez Ortiz, J.M., Swerdlow, R.H. (2019). Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: Role in pathogenesis and novel therapeutic opportunities. *British Journal of Pharmacology*, 176(18), 3489-3507.
 285. Pernas, L., Scorrano, L. (2016). Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annual Review of Physiology*, 78(1), 505-531.
 286. Perrone, S., Laschi, E., Buonocore, G. (2019). Biomarkers of oxidative stress in the fetus and in the newborn. *Free Radical Biology and Medicine*, 142, 23-31.
 287. Pietropaolo, S., Guillemot, A., Martin, B., D'Amato, F.R., Crusio, W.E. (2011). Genetic-Background Modulation of Core and Variable Autistic-Like Symptoms in *Fmr1* Knock-Out Mice. *PLoS One*, 6(2), e17073.
 288. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763.
 289. Prins, J.R., Gomez-Lopez, N., Robertson, S.A. (2012). Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. *J Reprod Immunol*, 95(1-2), 1-14.
 290. Prinz, M., Jung, S., Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*, 179(2), 292-311.
 291. Przybylska, D., Mosieniak, G. (2014). Rola oksydazy NADPH NOX4 w regulacji procesów proliferacji, starzenia i różnicowania komórek. *Postępy Biochemii*, 60(1).
 292. Racicot, K., Kwon, J.Y., Aldo, P., Silasi, M., Mor, G. (2014). Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 72(2), 107-116.
 293. Rahman, T., Zavitsanou, K., Purves-Tyson, T., Harms, L.R., Meehan, C., Schall, U., Todd, J., Hodgson, D.M., Michie, P.T., Weickert, C.S. (2017). Effects of immune activation during early or late gestation on N-methyl-d-aspartate receptor measures in adult rat offspring. *Frontiers in psychiatry*, 8, 77.
 294. Raichle, M.E. (2010). Two views of brain function. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(4), 180-190.
 295. Rani, L., Mondal, A.C. (2020). Emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease progression: Pathogenic and therapeutic implications. *Mitochondrion*, 50, 25-34.

296. Ransohoff, R.M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 19(8), 987-991.
297. Ravaccia, D., Ghafourian, T. (2020). Critical Role of the Maternal Immune System in the Pathogenesis of Autism Spectrum Disorder. *Biomedicines*, 8(12).
298. Reinhardt, V.P., Iosif, A.-M., Libero, L., Heath, B., Rogers, S.J., Ferrer, E., Nordahl, C., Ghetti, S., Amaral, D., Solomon, M. (2020). Understanding Hippocampal Development in Young Children With Autism Spectrum Disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 59(9), 1069-1079.
299. Reith, R.M., McKenna, J., Wu, H., Hashmi, S.S., Cho, S.H., Dash, P.K., Gambello, M.J. (2013). Loss of Tsc2 in Purkinje cells is associated with autistic-like behavior in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Neurobiol Dis*, 51, 93-103.
300. Reyes-Lagos, J.J., Peña-Castillo, M.Á., Echeverría, J.C., Pérez-Sánchez, G., Álvarez-Herrera, S., Becerril-Villanueva, E., Pavón, L., Ayala-Yáñez, R., González-Camarena, R., Pacheco-López, G. (2017). Women Serum Concentrations of the IL-10 Family of Cytokines and IFN- γ Decrease from the Third Trimester of Pregnancy to Active Labor. *Neuroimmunomodulation*, 24(3), 162-170.
301. Rice, C.E., Baio, J., Van Naarden Braun, K., Doernberg, N., Meaney, F.J., Kirby, R.S. (2007). A public health collaboration for the surveillance of autism spectrum disorders. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 21(2), 179-190.
302. Richetto, J., Labouesse, M.A., Poe, M.M., Cook, J.M., Grace, A.A., Riva, M.A., Meyer, U. (2015). Behavioral effects of the benzodiazepine-positive allosteric modulator SH-053-2'FS-CH3 in an immune-mediated neurodevelopmental disruption model. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(4).
303. Rodgers, J., Ofield, A. (2018). Understanding, Recognising and Treating Co-occurring Anxiety in Autism. *Current Developmental Disorders Reports*, 5(1), 58-64.
304. Roh, J.S., Sohn, D.H. (2018). Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*, 18(4), e27.
305. Romanowska-Próchnicka, K., Felis-Giemza, A., Olesińska, M., Wojdasiewicz, P., Paradowska-Gorycka, A., Szukiewicz, D. (2021). The Role of TNF- α and Anti-TNF- α Agents during Preconception, Pregnancy, and Breastfeeding. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2922.
306. Rose, D.R., Careaga, M., Van de Water, J., McAllister, K., Bauman, M.D., Ashwood, P. (2017). Long-term altered immune responses following fetal priming in a non-human primate model of maternal immune activation. *Brain Behav Immun*, 63, 60-70.
307. Rose, S., Melnyk, S., Pavliv, O., Bai, S., Nick, T.G., Frye, R.E., James, S.J. (2012). Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. *Translational Psychiatry*, 2(7), e134-e134.
308. Rosenzweig, J.M., Lei, J., Burd, I. (2014). Interleukin-1 receptor blockade in perinatal brain injury. *Front Pediatr*, 2, 108.
309. Rossi, M.J., Pekkurnaz, G. (2019). Powerhouse of the mind: mitochondrial plasticity at the synapse. *Curr Opin Neurobiol*, 57, 149-155.
310. Rüb, C., Wilkening, A., Voos, W. (2017). Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system. *Cell Tissue Res*, 367(1), 111-123.
311. Rylaarsdam, L., Guemez-Gamboa, A. (2019). Genetic Causes and Modifiers of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13.
312. Rynkiewicz, A., King, B., Kalisz, K., Słopeń, A., Janas-Kozik, M., Łucka, I. (2018). Competent users and standards of use for autism diagnostic interview-revised (ADI-R) and autism diagnostic observation schedule, (ADOS-2). *Journal of Psychiatry and Clinical Psychology*, 18(4), 399.

313. Rynkiewicz, A., Kulik, M. (2013). Wystandaryzowane, interaktywne narzędzia do diagnozy zaburzeń ze spektrum autyzmu a nowe kryteria diagnostyczne DSM-5. *Psychiatria*, 10(2), 41-48.
314. Sabouny, R., Shutt, T.E. (2020). Reciprocal Regulation of Mitochondrial Fission and Fusion. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(7), 564-577.
315. Saghazadeh, A., Ataenia, B., Keynejad, K., Abdolalizadeh, A., Hirbod-Mobarakeh, A., Rezaei, N. (2019). A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: Effects of age, gender, and latitude. *J Psychiatr Res*, 115, 90-102.
316. Sah, S.P., Tirkey, N., Kuhad, A., Chopra, K. (2011). Effect of quercetin on lipopolysaccharide induced-sickness behavior and oxidative stress in rats. *Indian J Pharmacol*, 43(2), 192-196.
317. Saitgareeva, A.R., Bulygin, K.V., Gareev, I.F., Beylerli, O.A., Akhmadeeva, L.R. (2020). The role of microglia in the development of neurodegeneration. *Neurological Sciences*, 41(12), 3609-3615.
318. Sams-Dodd, F., Lipska, B.K., Weinberger, D.R. (1997). Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)*, 132(3), 303-310.
319. Samuelsson, A.M., Jennische, E., Hansson, H.A., Holmäng, A. (2006). Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290(5), R1345-1356.
320. Santoni, M., Sagheddu, C., Serra, V., Mostallino, R., Castelli, M.P., Pisano, F., Scherma, M., Fadda, P., Muntoni, A.L., Zamberletti, E., Rubino, T., Melis, M., Pistis, M. (2023). Maternal immune activation impairs endocannabinoid signaling in the mesolimbic system of adolescent male offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 109, 271-284.
321. Santos, J.X., Rasga, C., Vicente, A.M. (2021). Exposure to xenobiotics and gene-environment interactions in autism spectrum disorder: a systematic review. *Autism Spectrum Disorder-Profile, Heterogeneity, Neurobiology and Intervention*, 133.
322. Sarniak, A., Lipińska, J., Tytman, K., Lipińska, S. (2016). Endogenne mechanizmy powstawania reaktywnych form tlenu (ROS). *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 70, 1150-1165.
323. Sasayama, D., Kurahashi, K., Oda, K., Yasaki, T., Yamada, Y., Sugiyama, N., Inaba, Y., Harada, Y., Washizuka, S., Honda, H. (2017). Negative Correlation between Serum Cytokine Levels and Cognitive Abilities in Children with Autism Spectrum Disorder. *J Intell*, 5(2).
324. Schaafsma, S.M., Gagnidze, K., Reyes, A., Norstedt, N., Månsson, K., Francis, K., Pfaff, D.W. (2017a). Sex-specific gene-environment interactions underlying ASD-like behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(6), 1383-1388.
325. Schaafsma, W., Basterra, L.B., Jacobs, S., Brouwer, N., Meerlo, P., Schaafsma, A., Boddeke, E., Eggen, B.J.L. (2017b). Maternal inflammation induces immune activation of fetal microglia and leads to disrupted microglia immune responses, behavior, and learning performance in adulthood. *Neurobiol Dis*, 106, 291-300.
326. Schaeffer, D.J., Hori, Y., Gilbert, K.M., Gati, J.S., Menon, R.S., Everling, S. (2020). Divergence of rodent and primate medial frontal cortex functional connectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(35), 21681-21689.
327. Schieber, M., Chandel, N.S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*, 24(10), R453-462.

328. Schneider, M. (2013). Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell and Tissue Research*, 354(1), 99-106.
329. Schumann, C.M., Hamstra, J., Goodlin-Jones, B.L., Lotspeich, L.J., Kwon, H., Buonocore, M.H., Lammers, C.R., Reiss, A.L., Amaral, D.G. (2004). The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. *Journal of neuroscience*, 24(28), 6392-6401.
330. Scott, K.E., Kazazian, K., Mann, R.S., Möhrle, D., Schormans, A.L., Schmid, S., Allman, B.L. (2020). Loss of Cntnap2 in the Rat Causes Autism-Related Alterations in Social Interactions, Stereotypic Behavior, and Sensory Processing. *Autism Research*, 13(10), 1698-1717.
331. Seager, R., Lee, L., Henley, Jeremy M., Wilkinson, Kevin A. (2020). Mechanisms and roles of mitochondrial localisation and dynamics in neuronal function. *Neuronal Signaling*, 4(2).
332. Semple, B.D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D.M., Noble-Haeusslein, L.J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*, 106-107, 1-16.
333. Severance, E.G., Xiao, J., Jones-Brando, L., Sabunciyani, S., Li, Y., Pletnikov, M., Prandovszky, E., Yolken, R. (2016). Toxoplasma gondii-A Gastrointestinal Pathogen Associated with Human Brain Diseases. *Int Rev Neurobiol*, 131, 143-163.
334. Shams, S., Foley, K.A., Kavaliers, M., MacFabe, D.F., Ossenkopp, K.-P. (2019). Systemic treatment with the enteric bacterial metabolic product propionic acid results in reduction of social behavior in juvenile rats: Contribution to a rodent model of autism spectrum disorder. *Developmental Psychobiology*, 61(5), 688-699.
335. Shanmugasundaram, K., Nayak, B.K., Friedrichs, W.E., Kaushik, D., Rodriguez, R., Block, K. (2017). NOX4 functions as a mitochondrial energetic sensor coupling cancer metabolic reprogramming to drug resistance. *Nature Communications*, 8(1), 997.
336. Shi, L., Smith, S.E., Malkova, N., Tse, D., Su, Y., Patterson, P.H. (2009). Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(1), 116-123.
337. Shields, H.J., Traa, A., Van Raamsdonk, J.M. (2021). Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
338. Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sato, K. (2018). Activated Microglia Disrupt the Blood-Brain Barrier and Induce Chemokines and Cytokines in a Rat in vitro Model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12.
339. Shim, S.Y., Kim, H.S. (2013). Oxidative stress and the antioxidant enzyme system in the developing brain. *Korean J Pediatr*, 56(3), 107-111.
340. Shin Yim, Y., Park, A., Berrios, J., Lafourcade, M., Pascual, L.M., Soares, N., Yeon Kim, J., Kim, S., Kim, H., Waisman, A. (2017). Reversing behavioural abnormalities in mice exposed to maternal inflammation. *Nature*, 549(7673), 482-487.
341. Shpungin, S., Dotan, I., Abo, A., Pick, E. (1989). Activation of the superoxide forming NADPH oxidase in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate: absolute lipid dependence of the solubilized enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 264(16), 9195-9203.
342. Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 715-748.
343. Simões, L.R., Sangiogo, G., Tashiro, M.H., Generoso, J.S., Faller, C.J., Dominguni, D., Mastella, G.A., Scaini, G., Giridharan, V.V., Michels, M., Florentino, D.,

- Petronilho, F., Réus, G.Z., Dal-Pizzol, F., Zugno, A.I., Barichello, T. (2018). Maternal immune activation induced by lipopolysaccharide triggers immune response in pregnant mother and fetus, and induces behavioral impairment in adult rats. *Journal of Psychiatric Research*, 100, 71-83.
344. Simpson, D.S.A., Oliver, P.L. (2020). ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants (Basel)*, 9(8).
345. Smith, G.M., Gallo, G. (2018). The role of mitochondria in axon development and regeneration. *Developmental Neurobiology*, 78(3), 221-237.
346. Smith, S.E., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., Patterson, P.H. (2007). Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*, 27(40), 10695-10702.
347. Smolders, S., Notter, T., Smolders, S.M.T., Rigo, J.M., Brône, B. (2018). Controversies and prospects about microglia in maternal immune activation models for neurodevelopmental disorders. *Brain Behav Immun*, 73, 51-65.
348. Snezhkina, A.V., Kudryavtseva, A.V., Kardymon, O.L., Savvateeva, M.V., Melnikova, N.V., Krasnov, G.S., Dmitriev, A.A. (2019). ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
349. Soares, N.L., Vieira, H.L.A. (2022). Microglia at the Centre of Brain Research: Accomplishments and Challenges for the Future. *Neurochemical Research*, 47(2), 218-233.
350. Socha, M.W., Flis, W., Pietrus, M., Wartęga, M., Stankiewicz, M. (2022). Signaling Pathways Regulating Human Cervical Ripening in Preterm and Term Delivery. *Cells*, 11(22), 3690.
351. Soszyński, D. (2004). „Sickness behavior”-mechanizmy powstania i znaczenie. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 58.
352. Soto, A.M.S., Kirsten, T.B., Reis-Silva, T.M., Martins, M.F.M., Teodorov, E., Flório, J.C., Palermo-Neto, J., Bernardi, M.M., Bondan, E.F. (2013). Single early prenatal lipopolysaccharide exposure impairs striatal monoamines and maternal care in female rats. *Life Sciences*, 92(14), 852-858.
353. Spear, L.P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(4), 417-463.
354. Specchio, N., Pietrafusa, N., Trivisano, M., Moavero, R., De Palma, L., Ferretti, A., Vigeveno, F., Curatolo, P. (2020). Autism and Epilepsy in Patients With Tuberous Sclerosis Complex. *Frontiers in Neurology*, 11.
355. Spence, T., Allsopp, P.J., Yeates, A.J., Mulhern, M.S., Strain, J.J., McSorley, E.M. (2021). Maternal Serum Cytokine Concentrations in Healthy Pregnancy and Preeclampsia. *Journal of pregnancy*, 2021, 6649608.
356. Sroka, R. (2012). Motoryka duża dzieci z autyzmem w wieku 3–7 lat. Różnice między wiekiem biologicznym i wiekiem rozwojowym oraz propozycje ćwiczeń usprawniających. *Zeszyty Naukowe. Prace Instytutu Kultury Fizycznej. Uniwersytet Szczeciński*, (28).
357. Steiner, A. (2009). S16. 2 Fever versus anapyrexia: Let the battle begin. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 149(1), 52.
358. Stellwagen, D., Malenka, R.C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*, 440(7087), 1054-1059.

359. Straley, M.E., Togher, K.L., Nolan, A.M., Kenny, L.C., O'Keeffe, G.W. (2014). LPS alters placental inflammatory and endocrine mediators and inhibits fetal neurite growth in affected offspring during late gestation. *Placenta*, 35(8), 533-538.
360. Straley, M.E., Van Oeffelen, W., Theze, S., Sullivan, A.M., O'Mahony, S.M., Cryan, J.F., O'Keeffe, G.W. (2017). Distinct alterations in motor & reward seeking behavior are dependent on the gestational age of exposure to LPS-induced maternal immune activation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 63, 21-34.
361. Subramanyam, C.S., Wang, C., Hu, Q., Dheen, S.T. (2019). Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 94, 112-120.
362. Suematsu, N., Tsutsui, H., Wen, J., Kang, D., Ikeuchi, M., Ide, T., Hayashidani, S., Shiomi, T., Kubota, T., Hamasaki, N., Takeshita, A. (2003). Oxidative Stress Mediates Tumor Necrosis Factor- α -Induced Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction in Cardiac Myocytes. *Circulation*, 107(10), 1418-1423.
363. Sun, Y., Koyama, Y., Shimada, S. (2022). Inflammation From Peripheral Organs to the Brain: How Does Systemic Inflammation Cause Neuroinflammation? *Front Aging Neurosci*, 14, 903455.
364. Suzuki, K., Sugihara, G., Ouchi, Y., Nakamura, K., Futatsubashi, M., Takebayashi, K., Yoshihara, Y., Omata, K., Matsumoto, K., Tsuchiya, K.J., Iwata, Y., Tsujii, M., Sugiyama, T., Mori, N. (2013). Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry*, 70(1), 49-58.
365. Takahashi, N., Kashino, M., Hironaka, N. (2010). Structure of rat ultrasonic vocalizations and its relevance to behavior. *PLoS One*, 5(11), e14115.
366. Talukdar, P.M., Abdul, F., Maes, M., Binu, V.S., Venkatasubramanian, G., Kutty, B.M., Debnath, M. (2020). Maternal Immune Activation Causes Schizophrenia-like Behaviors in the Offspring through Activation of Immune-Inflammatory, Oxidative and Apoptotic Pathways, and Lowered Antioxidant Defenses and Neuroprotection. *Molecular Neurobiology*, 57(10), 4345-4361.
367. Tang, B., Jia, H., Kast, R.J., Thomas, E.A. (2013a). Epigenetic changes at gene promoters in response to immune activation in utero. *Brain, Behavior, and Immunity*, 30, 168-175.
368. Tang, G., Gutierrez Rios, P., Kuo, S.-H., Akman, H.O., Rosoklija, G., Tanji, K., Dwork, A., Schon, E.A., DiMauro, S., Goldman, J., Sulzer, D. (2013b). Mitochondrial abnormalities in temporal lobe of autistic brain. *Neurobiology of Disease*, 54, 349-361.
369. Terzi, A., Suter, D.M. (2020). The role of NADPH oxidases in neuronal development. *Free Radical Biology and Medicine*, 154, 33-47.
370. Tetreault, N.A., Hakeem, A.Y., Jiang, S., Williams, B.A., Allman, E., Wold, B.J., Allman, J.M. (2012). Microglia in the cerebral cortex in autism. *J Autism Dev Disord*, 42(12), 2569-2584.
371. Thaxton, J.E., Sharma, S. (2010). REVIEW ARTICLE: Interleukin-10: A Multi-Faceted Agent of Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6), 482-491.
372. Thion, M.S., Ginhoux, F., Garel, S. (2018). Microglia and early brain development: An intimate journey. *Science*, 362(6411), 185-189.
373. Tick, B., Bolton, P., Happé, F., Rutter, M., Rijdsdijk, F. (2016). Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *J Child Psychol Psychiatry*, 57(5), 585-595.
374. Tonelli, C., Chio, I.I.C., Tuveson, D.A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*, 29(17), 1727-1745.

375. Tsai, P.T., Hull, C., Chu, Y., Greene-Colozzi, E., Sadowski, A.R., Leech, J.M., Steinberg, J., Crawley, J.N., Regehr, W.G., Sahin, M. (2012). Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature*, 488(7413), 647-651.
376. Tubío-Fungueiriño, M., Cruz, S., Sampaio, A., Carracedo, A., Fernández-Prieto, M. (2021). Social Camouflaging in Females with Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 51(7), 2190-2199.
377. Ufnal, M., Wolynczyk-Gmaj, D. (2011). The brain and cytokines—the mutual origin of depression, obesity and cardiovascular diseases? *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 65, 228-235.
378. Urakubo, A., Jarskog, L.F., Lieberman, J.A., Gilmore, J.H. (2001). Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophrenia Research*, 47(1), 27-36.
379. van 't Hof, M., Tisseur, C., van Berckeleer-Onnes, I., van Nieuwenhuyzen, A., Daniels, A.M., Deen, M., Hoek, H.W., Ester, W.A. (2021). Age at autism spectrum disorder diagnosis: A systematic review and meta-analysis from 2012 to 2019. *Autism*, 25(4), 862-873.
380. Vargas, D.L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A.W., Pardo, C.A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol*, 57(1), 67-81.
381. Vaure, C., Liu, Y. (2014). A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species. *Frontiers in Immunology*, 5.
382. Virzì, G.M., Mattiotti, M., de Cal, M., Ronco, C., Zanella, M., De Rosa, S. (2022). Endotoxin in Sepsis: Methods for LPS Detection and the Use of Omics Techniques. *Diagnostics (Basel)*, 13(1).
383. Voloboueva, L.A., Emery, J.F., Sun, X., Giffard, R.G. (2013). Inflammatory response of microglial BV-2 cells includes a glycolytic shift and is modulated by mitochondrial glucose-regulated protein 75/mortalin. *FEBS Letters*, 587(6), 756-762.
384. Vuillermot, S., Luan, W., Meyer, U., Eyles, D. (2017). Vitamin D treatment during pregnancy prevents autism-related phenotypes in a mouse model of maternal immune activation. *Molecular Autism*, 8(1), 9.
385. Walendzik, G., Nowak, V. (2021). Wsparcie osób z autyzmem i zespołem Aspergera: Przygotowanie do samodzielnego funkcjonowania. *Kontrola Państwowa*, 66(1 (396)), 59-74.
386. Wang, X., Yang, J., Zhang, H., Yu, J., Yao, Z. (2019). Oral probiotic administration during pregnancy prevents autism-related behaviors in offspring induced by maternal immune activation via anti-inflammation in mice. *Autism Research*, 12(4), 576-588.
387. Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol*, 217(6), 1915-1928.
388. Weber-Schoendorfer, C., Oppermann, M., Wacker, E., Bernard, N., Beghin, D., Cuppers-Maarschalkerweerd, B., Richardson, J.L., Rothuizen, L.E., Pistelli, A., Malm, H., Eleftheriou, G., Kennedy, D., Kadioglu Duman, M., Meister, R., Schaefer, C. (2015). Pregnancy outcome after TNF- α inhibitor therapy during the first trimester: a prospective multicentre cohort study. *Br J Clin Pharmacol*, 80(4), 727-739.
389. Wei, H., Alberts, I., Li, X. (2013). Brain IL-6 and autism. *Neuroscience*, 252, 320-325.
390. Wei, H., Zou, H., Sheikh, A.M., Malik, M., Dobkin, C., Brown, W.T., Li, X. (2011). IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration and synaptic formation. *J Neuroinflammation*, 8, 52.

391. Weissberg, O., Elliott, E. (2021). The Mechanisms of CHD8 in Neurodevelopment and Autism Spectrum Disorders. *Genes (Basel)*, 12(8).
392. Wendimu, M.Y., Hooks, S.B. (2022). Microglia Phenotypes in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Cells*, 11(13).
393. West, A.P., Shadel, G.S., Ghosh, S. (2011). Mitochondria in innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 11(6), 389-402.
394. Winczura, B. (2019). Wczesne rozpoznawanie autyzmu u małych dzieci–sygnały ostrzegawcze dla diagnozy zaburzeń ze spektrum autyzmu. *Psychiatria i Psychologia Kliniczna*, 19(2), 216-225.
395. Wojtala, A., Bonora, M., Malinska, D., Pinton, P., Duszynski, J., Wieckowski, M.R. (2014). Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. In *Methods in enzymology*, Elsevier, pp. 243-262.
396. Wojtczak, L., Zablocki, K. (2008). Mitochondria w życiu, chorobie i śmierci komórki. *Postępy Biochemii*, 54(2).
397. Wong, H., Hoeffler, C. (2018). Maternal IL-17A in autism. *Exp Neurol*, 299(Pt A), 228-240.
398. Wozniak, R.H., Leezenbaum, N.B., Northrup, J.B., West, K.L., Iverson, J.M. (2017). The development of autism spectrum disorders: variability and causal complexity. *WIREs Cognitive Science*, 8(1-2), e1426.
399. Wu, H.X., Jin, L.P., Xu, B., Liang, S.S., Li, D.J. (2014). Decidual stromal cells recruit Th17 cells into decidua to promote proliferation and invasion of human trophoblast cells by secreting IL-17. *Cell Mol Immunol*, 11(3), 253-262.
400. Wu, S., Wu, F., Ding, Y., Hou, J., Bi, J., Zhang, Z. (2017a). Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand*, 135(1), 29-41.
401. Wu, W.L., Hsiao, E.Y., Yan, Z., Mazmanian, S.K., Patterson, P.H. (2017b). The placental interleukin-6 signaling controls fetal brain development and behavior. *Brain Behav Immun*, 62, 11-23.
402. Wu, Y., Qi, F., Song, D., He, Z., Zuo, Z., Yang, Y., Liu, Q., Hu, S., Wang, X., Zheng, X., Yang, J., Yuan, Q., Zou, J., Guo, K., Yao, Z. (2018). Prenatal influenza vaccination rescues impairments of social behavior and lamination in a mouse model of autism. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 228.
403. Xiang, A.H., Wang, X., Martinez, M.P., Page, K., Buchanan, T.A., Feldman, R.K. (2018). Maternal Type 1 Diabetes and Risk of Autism in Offspring. *Jama*, 320(1), 89-91.
404. Xie, J., Huang, L., Li, X., Li, H., Zhou, Y., Zhu, H., Pan, T., Kendrick, K.M., Xu, W. (2017). Immunological cytokine profiling identifies TNF- α as a key molecule dysregulated in autistic children. *Oncotarget*, 8(47), 82390-82398.
405. Xu, N., Li, X., Zhong, Y. (2015). Inflammatory cytokines: potential biomarkers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *Mediators Inflamm*, 2015, 531518.
406. Yagami, T., Koma, H., Yamamoto, Y. (2016). Pathophysiological Roles of Cyclooxygenases and Prostaglandins in the Central Nervous System. *Molecular Neurobiology*, 53(7), 4754-4771.
407. Yamashita, Y., Fujimoto, C., Nakajima, E., Isagai, T., Matsuishi, T. (2003). Possible association between congenital cytomegalovirus infection and autistic disorder. *J Autism Dev Disord*, 33(4), 455-459.

408. Yang, F., Zheng, Q., Jin, L. (2019). Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface. *Front Immunol*, 10, 2317.
409. Yockey, L.J., Iwasaki, A. (2018). Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. *Immunity*, 49(3), 397-412.
410. Youle, R.J., Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1), 9-14.
411. Young, H., Oreve, M.J., Speranza, M. (2018). Clinical characteristics and problems diagnosing autism spectrum disorder in girls. *Arch Pediatr*, 25(6), 399-403.
412. Younus, H. (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim)*, 12(3), 88-93.
413. Yue, X., Wu, L., Hu, W. (2015). The regulation of leukemia inhibitory factor. *Cancer Cell Microenviron*, 2(3).
414. Zaretsky, M.V., Alexander, J.M., Byrd, W., Bawdon, R.E. (2004). Transfer of inflammatory cytokines across the placenta. *Obstet Gynecol*, 103(3), 546-550.
415. Zavitsanou, K., Lim, C.K., Purves-Tyson, T., Karl, T., Kassiou, M., Banister, S.D., Guillemin, G.J., Weickert, C.S. (2014). Effect of maternal immune activation on the kynurenine pathway in preadolescent rat offspring and on MK801-induced hyperlocomotion in adulthood: Amelioration by COX-2 inhibition. *Brain, Behavior, and Immunity*, 41, 173-181.
416. Zawadzka, A., Cieřlik, M., Adamczyk, A. (2021). 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(21).
417. Zehnder, T., Petrelli, F., Romanos, J., De Oliveira Figueiredo, E.C., Lewis, T.L., Dęglon, N., Polleux, F., Santello, M., Bezzi, P. (2021). Mitochondrial biogenesis in developing astrocytes regulates astrocyte maturation and synapse formation. *Cell Reports*, 35(2), 108952.
418. Zeiss, C.J. (2021). Comparative Milestones in Rodent and Human Postnatal Central Nervous System Development. *Toxicol Pathol*, 49(8), 1368-1373.
419. Zerbo, O., Qian, Y., Yoshida, C., Grether, J.K., Van de Water, J., Croen, L.A. (2015). Maternal Infection During Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 45(12), 4015-4025.
420. Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 4350965.
421. Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., Hauser, C.J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 464(7285), 104-107.
422. Zhang, X., Ibi, M., Haga, R., Iwata, K., Matsumoto, M., Asaoka, N., Liu, J., Katsuyama, M., Yabe-Nishimura, C. (2021). NOX1/NADPH oxidase affects the development of autism-like behaviors in a maternal immune activation model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 534, 59-66.
423. Zhang, Z., van Praag, H. (2015). Maternal immune activation differentially impacts mature and adult-born hippocampal neurons in male mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 45, 60-70.
424. Zhao, B., Schwartz, J.P. (1998). Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. *J Neurosci Res*, 52(1), 7-16.
425. Zhao, R.Z., Jiang, S., Zhang, L., Yu, Z.B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med*, 44(1), 3-15.

426. Zheng, Z., Li, Y., Jin, G., Huang, T., Zou, M., Duan, S. (2020). The biological role of arachidonic acid 12-lipoxygenase (ALOX12) in various human diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110354.
427. Zhou, J., Miao, H., Li, X., Hu, Y., Sun, H., Hou, Y. (2017). Curcumin inhibits placental inflammation to ameliorate LPS-induced adverse pregnancy outcomes in mice via upregulation of phosphorylated Akt. *Inflammation Research*, 66(2), 177-185.
428. Zhu, Y., Gao, H., Tong, L., Li, Z., Wang, L., Zhang, C., Yang, Q., Yan, B. (2019). Emotion Regulation of Hippocampus Using Real-Time fMRI Neurofeedback in Healthy Human. *Frontiers in Human Neuroscience*, 13.
429. Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., Trnkova, L., Kruseova, J., Eckschlager, T., Kizek, R. (2012). Redox status expressed as GSH: GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology letters*, 4(6), 1247-1253.
430. Zuckerman, K.E., Lindly, O.J., Sinche, B.K. (2015). Parental concerns, provider response, and timeliness of autism spectrum disorder diagnosis. *J Pediatr*, 166(6), 1431-1439.e1431.
431. Zwaigenbaum, L., Bryson, S., Lord, C., Rogers, S., Carter, A., Carver, L., Chawarska, K., Constantino, J., Dawson, G., Dobkins, K., Fein, D., Iverson, J., Klin, A., Landa, R., Messinger, D., Ozonoff, S., Sigman, M., Stone, W., Tager-Flusberg, H., Yirmiya, N. (2009). Clinical Assessment and Management of Toddlers With Suspected Autism Spectrum Disorder: Insights From Studies of High-Risk Infants. *Pediatrics*, 123(5), 1383-1391.