Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(2):177-184
DOI 10.18699/VJGB-23-14

Английский текст https://vavilov.elpub.ru/jour

Изменения в социальном предпочтении места и плотность дофаминергических нейронов в вентральном тегментуме у Clsnt2-KO мышей

И.Н. Рожкова[1], С.В. Окотруб[1], Е.Ю. Брусенцев[1], Е.Е. Ульданова[1], Э.А. Чуйко[1], В.А. Напримеров[1, 2], Т.В. Липина[3], Т.Г. Амстиславская[4], С.Я. Амстиславский[1] ✉

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия
[3] Университет Торонто, Торонто, Канада
[4] Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия
✉ amstis@yandex.ru

Аннотация. В мире наблюдается рост случаев расстройств аутистического спектра (РАС). Исследование механизмов и причин возникновения РАС, а также поиск мишеней для терапии этих расстройств являются актуальной задачей. Многие исследователи сходятся во мнении, что возникновение аутизма связано с нарушением развития нервной системы. Линия мышей Clstn2-KO, нокаутов по гену кальсинтенин-2, полученная на основе C57BL/6J, моделирует симптомы РАС. Данное исследование было направлено на изучение у самцов Clstn2-KO социального предпочтения места и плотности дофаминергических нейронов в вентральном тегментуме, который представляет собой часть системы вознаграждения головного мозга, в сравнении с контрольной линией мышей C57BL/6J дикого типа. Тест «социально обусловленное предпочтение места» отражает социальное вознаграждение. Результаты этого теста показали, что у самцов Clstn2-KO наблюдаются отклонения от контрольных мышей в социальном вознаграждении, так как они проводили одинаковое время в обоих отсеках установки, ассоциированных либо с изоляцией, либо с социализацией со знакомым партнером. При этом животные из группы Clstn2-KO заходили в обе части камеры значительно чаще, но проводили меньше времени в социально-ассоциированном отсеке по сравнению с контрольной группой. Самцы контрольной линии C57BL/6J, напротив, проводили больше времени в отсеке, ассоциированном с социализацией, где было взаимодействие с сородичем, и меньше в отсеке, в котором ранее особь находилась в одиночестве. В вентральном тегментуме, отвечающем за процессы, связанные с вознаграждением, у мышей Clstn2-KO было обнаружено повышенное число дофаминергических нейронов и, возможно, ГАМК-ергических нейронов, меченных антителами против дофаминового рецептора второго типа и тирозингидроксилазы. На основании полученных результатов можно заключить, что у мышей Clstn2-KO имеет место изменение значимости социального вознаграждения, а также обнаружено повышенное число нейронов, экспрессирующих дофаминовые рецепторы второго типа и тирозингидроксилазу, в одной из важных структур мезолимбического дофаминергического пути – вентральном тегментуме, который является частью системы вознаграждения.

Ключевые слова: мыши Clstn2-KO; социальное вознаграждение; мозг; вентральный тегментум; дофаминергические нейроны.

Для цитирования: Рожкова И.Н., Окотруб С.В., Брусенцев Е.Ю., Ульданова Е.Е., Чуйко Э.А., Напримеров В.А., Липина Т.В., Амстиславская Т.Г., Амстиславский С.Я. Изменения в социальном предпочтении места и плотность дофаминергических нейронов в вентральном тегментуме у Clsnt2-KO мышей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(2): 177-184. DOI 10.18699/VJGB-23-14

Alterations in the social-conditioned place preference and density of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area in Clsnt2-KO mice

I.N. Rozhkova[1], S.V. Okotrub[1], E.Yu. Brusentsev[1], K.E. Uldanova[1], E.A. Chuyko[1], V.A. Naprimerov[1, 2], T.V. Lipina[3], T.G. Amstislavskaya[4], S.Ya. Amstislavsky[1] ✉

[1] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State Agricultural University, Novosibirsk, Russia
[3] University of Toronto, Toronto, Canada
[4] Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia
✉ amstis@yandex.ru

Abstract. The incidence of autistic spectrum disorders (ASD) constantly increases in the world. Studying the mechanisms underlying ASD as well as searching for new therapeutic targets are crucial tasks. Many researchers agree that autism is a neurodevelopmental disorder. Clstn2-KO mouse strain with a knockout of calsyntenin 2 gene (*Clstn2*) is model for inves-

tigating ASD. This study aims to evaluate the social-conditioned place preference as well as density of dopaminergic (DA) neurons in the ventral tegmental area (VTA), which belongs to the brain reward system, in the males of the Clstn2-KO strain using wild type C57BL/6J males as controls. Social-conditioned place preference test evaluates a reward-dependent component of social behavior. The results of this test revealed differences between the Clstn2-KO and the control males, as the former did not value socializing with the familiar partner, spending equal time in the isolation- and socializing-associated compartments. The Clstn2-KO group entered both compartments more frequently, but spent less time in the socializing-associated compartment compared to the controls. By contrast, the control males of the C57BL/6J strain spent more time in socializing-associated compartment and less time in the compartment that was associated with loneness. At the same time, an increased number of DA and possibly GABA neurons labeled with antibodies against the type 2 dopamine receptor as well as against tyrosine hydroxylase were detected in the VTA of the Clstn2-KO mice. Thus, a change in social-conditioned place preference in Clstn2-KO mice as well as a higher number of neurons expressing type 2 dopamine receptors and tyrosine hydroxylase in the VTA, the key structure of the mesolimbic dopaminergic pathway, were observed.
Key words: Clstn2-KO mice; social behavior; brain; ventral tegmental area; dopaminergic neurons.

For citation: Rozhkova I.N., Okotrub S.V., Brusentsev E.Yu., Uldanova K.E., Chuyko E.A., Naprimerov V.A., Lipina T.V., Amstislavskaya T.G., Amstislavsky S.Ya. Alterations in the social-conditioned place preference and density of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area in Clsnt2-KO mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(2):177-184. DOI 10.18699/VJGB-23-14

Введение

Расстройства аутистического спектра (РАС) у детей характеризуются нарушением социального взаимодействия, снижением интереса к сверстникам и трудностями в поддержании социальных контактов (Autism spectrum disorder, 2013). Многие исследователи сходятся во мнении, что причиной аутизма является нарушение развития нервной системы (Bourgeron, 2009; Buxbaum, 2009; Marshall, Mason, 2019; Sawicka et al., 2019; Girault, Piven, 2020; Yang, Shcheglovitov, 2020). Одна из отличительных характеристик РАС – дисбаланс между возбуждением и торможением в различных структурах головного мозга (Canitano, 2007), что вызвано аномальным формированием взаимодействий между нейронами и нарушением синаптической пластичности (Zoghbi, 2003). В ряде работ, посвященных изучению РАС, были выявлены мутации в генах, кодирующих белки адгезии, которые играют ключевую роль в межклеточных соединениях, включая межнейронные и нейроглиальные контакты (Bourgeron, 2009; Buxbaum, 2009). Например, нарушения синтеза нейрексина, нейролигинов, контактинов и кадгеринов могут быть связаны с развитием РАС у людей (Bourgeron, 2009; Buxbaum, 2009). У соответствующих линий мышей, моделирующих эти расстройства, также может быть нарушена экспрессия генов, отвечающих за образование этих белков (Lipina et al., 2016; Zhang Q. et al., 2019).

Кальсинтенин-1, -2 и -3 (Clstn1, Clstn2 и Clstn3), принадлежащие к семейству кадгеринов, являются белками синаптической адгезии, которые способны связывать ионы Ca^{2+} и регулировать их внутриклеточную концентрацию. Особый интерес представляет Clstn2, который специфически экспрессируется в тормозных интернейронах (Hintsch et al., 2002) и ассоциирован с вербальной памятью у подростков (Jacobsen et al., 2009), а также семантическими и когнитивными характеристиками у пожилых людей (Laukka et al., 2013). Более того, генетический анализ вариаций числа копий генов у больных аутизмом обнаружил делецию 2-го интрона гена *Clstn2* (AlAyadhi et al., 2016). Согласно The Human Protein Atlas (https://www.proteinatlas.org/), Clstn2 у мышей экспрессируется в гиппокампе и других структурах мозга, в том числе в среднем мозге. Для изучения функции этого белка была создана модель мышей с нокаутом по гену *Clstn2* (Clstn2-KO) на основе C57BL/6J (Lipina et al., 2016). Как показано нами ранее, отсутствие Clstn2 у мышей вызывает избирательный дефицит тормозных интернейронов в префронтальной коре и гиппокампе (Lipina et al., 2016). Это сопровождается проявлением РАС-подобных состояний, включающих стереотипию, недостаточную социальную мотивацию, аномальную ультразвуковую вокализацию (Ranneva et al., 2017; Klenova et al., 2021), а также морфологические изменения синапсов (Ranneva et al., 2020).

Ранее у детей с РАС были обнаружены структурные и функциональные нарушения в мезолимбическом дофаминергическом тракте, куда входит вентральный тегментум и прилежащие ядра, а также выявлена связь этих изменений в системе вознаграждения с недоразвитием социальных навыков при аутизме (Supekar et al., 2018). Исследования показывают, что синаптические белки, связанные с развитием РАС (Huguet et al., 2016), играют важную роль в функционировании мезолимбического пути дофаминергической (ДС) и ГАМК-ергической систем головного мозга (Hart et al., 2012; Karayannis et al., 2014), одним из ключевых компонентов которого выступает вентральный тегментум, относящийся к структурам среднего мозга (Lammel et al., 2008; Morales, Margolis, 2017). Вентральный тегментум является важной частью системы вознаграждения (reward system) (Sesack, Grace, 2010) и регулирует поведенческие процессы в ответ на вознаграждение/наказание, включая социальное подкрепление (Gunaydin, Deisseroth, 2014; Saunders et al., 2015). В вентральном тегментуме располагаются тела дофаминергических нейронов, а также глутаматергические и ГАМК-ергические нейроны (Saunders et al., 2015). Терминали дофаминергических нейронов дофаминового мезолимбического пути характеризуются сотрансмиссией, т. е. способностью высвобождать различные нейромедиаторы, в частности дофамин, глутамат и ГАМК (Root et al., 2014; Zhang S. et al., 2015; Berrios et al., 2016).

Одна из теорий аутизма базируется на представлении о том, что социальная мотивация при аутизме снижена в связи с нарушением в системе вознаграждения мозга (Kohls et al., 2012). Хотя развитие нейрональных механизмов, затрагивающих подкорковые системы мозга, критично в первые месяцы развития, структуры мозга, вовлеченные в процессы вознаграждения, т.е. в формирование и корректировку поведения при помощи положительных реакций на различные стимулы, задействованы в процессе всей жизни (Kohls et al., 2012, 2014). Нарушение баланса между социальной и несоциальной мотивациями отражает особенность функционирования системы вознаграждения при аутизме (Kohls et al., 2014). В целом данная теория утверждает, что система вознаграждения при РАС гиперактивна в ответ на интересы, не связанные с социализацией, в то время как нарушение социального поведения, возможно, приводит к гипоактивности системы вознаграждения в ответ на социально значимые стимулы (Kohls et al., 2012, 2014).

Нейробиологическая система вознаграждения включает дофаминовые нейроны вентрального тегментума, которые имеют проекции преимущественно в прилежащее ядро и префронтальную кору, и регулирует социальную мотивацию (Saunders et al., 2015). Так, было показано, что дофаминовые нейроны системы вознаграждения повышают свою активность во время взаимодействия мыши с сородичем (Solie et al., 2022). Характерной чертой дофаминергических нейронов является то, что они в качестве нейромедиатора выделяют дофамин, а также содержат фермент тирозингидроксилазу (ТГ), необходимый для его синтеза (Morales, Margolis, 2017). В работе (Lammel et al., 2008) исследователи рассматривают два типа дофаминергических нейронов в вентральном тегментуме. Нейроны первого типа имеют ТГ и рецептор дофамина второго типа (D2R), а их окончания идут в оболочку прилежащих ядер и дорсолатеральный стриатум. Нейроны второго типа имеют ТГ, но не имеют D2R, а их окончания идут в префронтальную кору, ядро и медиальную зону оболочки прилежащих ядер, а также базолатеральную часть миндалевидных ядер. Дофаминовый рецептор второго типа, который может экспрессироваться не только на дофаминергических, но и на ГАМК-ергических нейронах (Lammel et al., 2008; Margolis et al., 2012; Morales, Margolis, 2017), ассоциирован с аддиктивным поведением, в котором активное участие принимает система вознаграждения головного мозга, в частности вентральный тегментум (Bello et al., 2011).

Социальное поведение проявляется у мышей в разных контекстах, включая взаимодействия внутри однополых и разнополых групп, а также игровое поведение на ранней стадии развития и взаимодействие между матерью и детенышем (Chen, Hong, 2018). Тест на социально обусловленное предпочтение места оценивает социальное вознаграждение у молодых и взрослых мышей, когда определенный контекст ассоциирован с положительным социальным взаимодействием со знакомым партнером (Panksepp, Lahvis, 2007; Lipina et al., 2013; Lan et al., 2019). Исходя из этого мы предположили, что РАС-подобное социальное поведение может быть связано с нарушением функционирования одного или нескольких элементов мезолимбического дофаминергического пути, который играет важную роль в регуляции социального предпочтения (Gunaydin, Deisseroth, 2014).

Цель данной работы заключалась в изучении социального вознаграждения у мышей с нокаутом по гену *Clstn2* (Clstn2-KO), а также исследовании плотности нейронов, содержащих рецепторы дофамина второго типа и тирозингидроксилазу, в вентральном тегментуме.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В исследовании использовали 7 самцов Clstn2-KO, а также 5 самцов дикого типа (линия C57BL/6J) в возрасте трех месяцев. Животных содержали в однополых группах по 3–5 особей в клетках размером 36 × 25 × 14 см (длина × ширина × высота) с подстилкой из древесной стружки в конвенциональном виварии НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск. Режим 12Д:12Н при 20–22 °C, свободном доступе к полнорационному сухому гранулированному корму для лабораторных грызунов и очищенной воде. Все исследования соответствовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS № 123).

Тест социально обусловленного предпочтения места. Исследование проводили, как описано ранее (Panksepp, Lahvis, 2007; Lipina et al., 2013; Lan et al., 2019), с небольшими модификациями. Кратко основные этапы методики описаны ниже. Накануне эксперимента животных рассаживали по одному на 24 ч. Экспериментальная камера состояла из трех отсеков. Два отсека (между которыми находился третий – промежуточный отсек) были разделены съемными перегородками. Твердый пол, изготовленный из полипропилена, имел разное покрытие: шершавое и гладкое. Перед тестированием мышей адаптировали к экспериментальной камере и оценивали выбор мышами текстуры пола в используемой поведенческой установке, чтобы исключить возможность заведомого предпочтения той или иной поверхности (сессия «адаптация»). Оценку проводили визуально с помощью секундомера по времени пребывания (в секундах) в каждом из отсеков в течение 20 мин. После адаптации исследуемых животных рассаживали в отдельные клетки на 24 ч. Далее начинали основной эксперимент.

Отсек с шершавой поверхностью был ассоциирован с социальным взаимодействием, так как здесь исследуемая мышь контактировала со своим знакомым сородичем того же пола, возраста и генотипа, а отсек с гладкой поверхностью был ассоциирован с изоляцией, где особь находилась одна. Процедура формирования «ассоциации» типа поверхности с контекстом отсека проходила три дня. На первый день эксперимента мышь помещали на 20 мин в отсек с шершавым полом для социализации со знакомым партнером. Через три часа животное перемещали в отсек с гладким полом, в котором оно находилось в одиночестве 20 мин. На второй день исследуемую мышь сначала сажали в отсек с гладкой поверхностью, где она находилась в одиночестве в течение 20 мин, а через три часа переносили ее в отсек с шершавой поверхностью с партнером на 20 мин. На третий день эксперимента условия повторяли, как описано для первого дня. Важно отметить, что знакомый партнер в течение 20-минутной социализации оставался один и тот же для каждого экспериментального животного в течение трех дней формирования социального вознаграждения. После каждой 20-минутной сессии поверхности обрабатывали 70 % спиртом для устранения запахов и тщательно просушивали установку. На четвертый день мыши исследовали установку в течение 15 мин (сессия «базового поведения»). На пятый день эксперимента (тест на социальное вознаграждение) каждую мышь помещали в центральный отсек пустой установки, убирали перегородки, давая возможность для свободного перемещения, и засекали время, проведенное в отсеках с гладкой и шершавой текстурой пола в течение 20 мин. Оценку делали визуально с использованием секундомера. Критерием нахождения мыши в том или ином отсеке считали пересечение отсека (шершавого или гладкого) всем телом животного (все четыре лапы животного находятся в отсеке либо с шершавым, либо с гладким покрытием пола).

Интракардиальная перфузия. Всем животным, участвовавшим в поведенческом эксперименте, на следующий день после его окончания осуществляли перфузию через систему кровообращения для фиксации головного мозга. Мышей наркотизировали, вводя им внутримышечно 75 мкл (на 10 г веса) медетомидина гидрохлорида (Медитин, 1 мг/мл; АПИ-САН, Россия) и 60 мкл (на 10 г веса) золетила (Virbac, Франция). Далее им вводили через кровеносную систему 30–50 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), а затем 10 % раствор формалина на PBS. После этого мозг извлекали и помещали в 30 % раствор сахарозы на PBS при +4 °С для обезвоживания и последующей фиксации в течение следующих 3–4 недель, пока фиксированный материал не опустится на дно колбы. Образцы мозга замораживали с помощью Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, США) и хранили при –70 °С.

Приготовление замороженных срезов мозга. Три животных были выбраны случайным образом для каждой группы с целью гистологического анализа. Замороженные срезы мозга от каждого из этих животных были сделаны на расстоянии –2.92…–3.28 мм от брегмы, что соответствует области вентрального тегментума. Срезы толщиной 10 мкм получали на криотоме HM550 OP (Thermo Fisher Scientific, США) при –25 °С и помещали на предметные стекла Superfrost Plus, Menzel-Glaser (Thermo Fisher Scientific).

Иммуногистохимическое окрашивание образцов проводили согласно протоколам производителей, с небольшими модификациями. Вкратце: после процедуры отмывания и воздействия Protein Block ab64226 (Abcam, Великобритания) добавляли 50 мкл соответствующего антитела и оставляли во влажной темной камере на ночь при +4 °С. Концентрация антител составляла 1:400 и 1:800 – anti-D2R-AF647 sc-5303 (Santa Cruz Biotechnology, США) и anti-TH-AF488 MAB318-AF488 (Merck, Германия) соответственно. После этого образцы промывали в PBS-Tween, удаляли избыток жидкости и помещали в среду ProLong, Glass Antifade Mountant, Thermo P36982 (Thermo Fisher Scientific).

Анализ плотности нейронов. С помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия) с использованием объектива Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 (Carl Zeiss) на исследовательской базе ЦКП Микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (https://ckp.icgen.ru/ckpmabo/) были получены изображения, по которым оценивали плотность нейронов, меченных антителами. Число этих клеток подсчитывали вручную, т.е. без специальных программ для подсчета, минимум в трех срезах на животное, в поле зрения 10000 мкм^2 (одно поле зрения на один срез). Так как в функциональном плане вентральный тегментум является гетерогенной структурой (Sanchez-Catalan et al., 2014), мы брали срезы на протяжении всей толщины данной области, которые соответствуют определенному расстоянию от брегмы, а именно: началу вентрального тегментума (–2.92 мм), центральной части (–3.16 мм) и каудальной части (–3.28 мм) согласно атласу (Paxinos, Franklin, 2001). Для создания поля зрения (10000 мкм^2) использовали программу ImageJ. Вычисляли среднее число клеток с трех срезов для каждого животного и рассчитывали среднюю плотность в объеме (мм^3).

Статистический анализ результатов выполняли в программном пакете STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc., США). Все данные были проверены на нормальность с помощью W-критерия Шапиро–Уилка. Данные о поведенческих параметрах представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (M ± SEM). Сравнение между группами проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Данные по плотности нейронов представлены как медиана с первым и третьим квартилями – Me [Q1;Q3]. Плотность меченых нейронов между группами сравнивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Уровень значимости принимали при $p < 0.05$.

Результаты

В предварительном тестировании перед началом основного эксперимента у самцов контрольной группы (C57BL/6J) и самцов Clstn2-KO не было обнаружено достоверных различий между временем, проведенным в отсеках с гладким (499.8 ± 43.6 и 490.5 ± 37.0 с) и шершавым (550.7 ± 17.8 и 472.8 ± 28.3 с) полом соответственно, что исключает предпочтение определенного отсека мышами обеих исследуемых групп. Результаты основного теста представлены в таблице. Самцы контрольной группы проводили больше времени ($p < 0.05$) в социально-ассоциированном отсеке, где было взаимодействие с конспецификом, по сравнению с отсеком, в котором ранее особь находилась в одиночестве. Между тем мыши Clstn2-KO проводили в обоих отсеках одинаковое время. При этом животные из группы Clstn2-KO заходили в обе части камеры значительно чаще ($p < 0.001$), но проводили меньше времени ($p < 0.05$) в социально-ассоциированном отсеке по сравнению с мышами контрольной группы.

Данные по плотности нейронов, меченных D2R и ТГ в вентральном тегментуме, представлены на рис. 1 и 2. Статистический анализ выявил более высокую ($p < 0.001$) плотность нейронов, меченных anti-D2R и anti-TH, у нокаутных мышей Clstn2-KO в исследуемой области по сравнению с контролем.

Обсуждение

Ранее на мышах разных линий (C57BL, DBA, BALB, Disc1-Q31L) уже применяли тест социально обусловленного предпочтения места (Panksepp, Lahvis, 2007; Lipina et al., 2013; Lan et al., 2019). Было показано, что в норме животные проводят больше времени в отсеке, где до это-

Социально обусловленное предпочтение места

Параметры	Линия (число самцов)	
	C57BL/6J ($n = 5$)	Clstn2-KO ($n = 7$)
Время в отсеке, ассоциированном с изоляцией, с	359.28 ± 71.71	457.54 ± 47.66
Время в социально обусловленном отсеке, с	648.24 ± 74.56*	461.06 ± 24.55+
Число заходов в отсек, ассоциированный с изоляцией	14.80 ± 2.24	30.57 ± 2.79+++
Число заходов в социально обусловленный отсек	15.80 ± 1.77	31.43 ± 2.52+++

*$p < 0.05$ по сравнению со временем в отсеке, ассоциированном с изоляцией; +$p < 0.05$ по сравнению с C57BL/6J; +++$p < 0.001$ по сравнению с C57BL/6J.

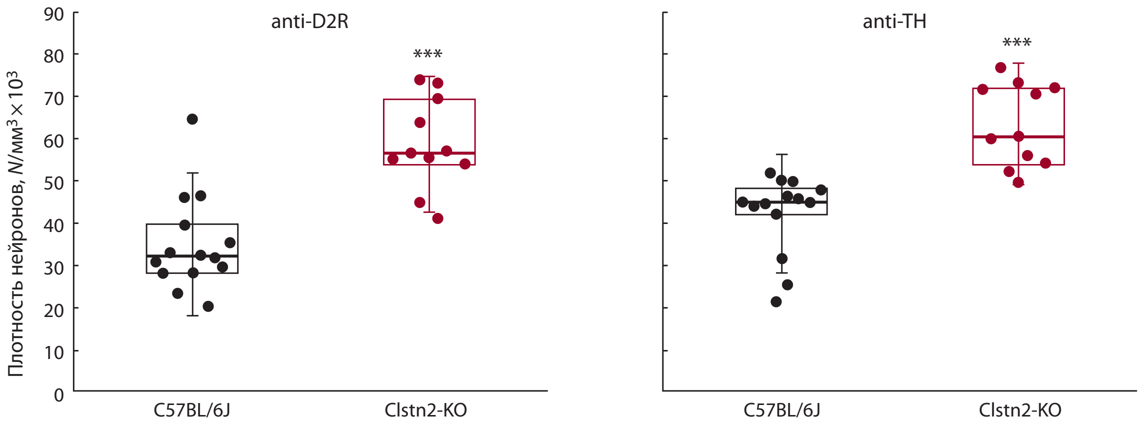

Рис. 1. Плотность нейронов, меченных anti-D2R и anti-TH в вентральном тегментуме.

N – число нейронов в поле зрения. ● – плотность нейронов, полученная при расчете с одного среза. Верхняя и нижняя границы прямоугольников соответствуют первому и третьему квартилям; жирная горизонтальная линия – медиана; вертикальные линии – стандартное отклонение. ***$p < 0.001$ по сравнению с C57BL/6J.

го они контактировали с сородичами; эти данные соответствуют представлениям о том, что социально обусловленное предпочтение места отражает социальное вознаграждение (Panksepp, Lahvis, 2007). В нашем исследовании мы изучали социальное предпочтение места, а также плотность нейронов, меченных антителами против D2R и ТГ, в вентральном тегментуме у самцов Clstn2-KO и контрольных мышей дикого типа (C57BL/6J). В тесте «социально обусловленное предпочтение места» мыши Clstn2-KO существенно чаще заходили в оба отсека. Видимо, это вызвано их более высоким уровнем двигательной активности по сравнению с контролем, что согласуется с описанной в более ранней работе гиперактивностью данных животных (Lipina et al., 2016). Возможно, мыши Clstn2-KO на фоне гиперактивности оказались не способны сформировать устойчивое подкрепление, вызванное ежедневной социализацией со знакомым партнером, и, как следствие, выразить свое предпочтение «социальному» отсеку камеры. В целом снижение социального предпочтения места в этом тесте, наблюдаемое у мышей Clstn2-KO, хорошо согласуется с выявленным нарушением социального поведения, характерным для этих животных (Ranneva et al., 2017; Klenova et al., 2021).

В настоящем исследовании мы сосредоточились на изучении нейронов, экспрессирующих дофаминовые рецепторы второго типа и тирозингидроксилазы в вентральном тегментуме. И у мышей Clstn2-KO, и у C57BL/6J число нейронов, меченных антителами против ТГ, было несколько больше, чем число нейронов, меченных против D2R. Очевидно, это связано с тем фактом, что не только дофаминергические нейроны вентрального тегментума, в которых обнаружена тирозингидроксилаза, имеют дофаминовые рецепторы второго типа. Такие рецепторы имеются и на ГАМК-ергических нейронах (Lammel et al., 2008; Morales, Margolis, 2017). Между тем мы обнаружили большее число нейронов как с дофаминовыми рецепторами второго типа, так и с тирозингидроксилазой в вентральном тегментуме мышей Clstn2-KO по сравнению с контрольными животными.

В ходе работы установлено, что в вентральном тегментуме у мышей линии Clstn2-KO имеется больше нейронов, содержащих D2R, а также тирозингидроксилазу, по сравнению с мышами C57BL. Наши данные, как и результаты, полученные на других линиях мышей, моделирующих РАС (Squillace et al., 2014; Bariselli et al., 2016, 2018; Chao et al., 2020; Tassan Mazzocco et al., 2021), указывают на изменения в мезолимбическом дофаминовом пути, которые играют важную роль и при РАС у человека (Supekar et al., 2018). Так, в эксперименте на мышах линии BTBR, несмотря на то, что у них не обнаружено функциональных изменений в D1R в стриатуме, наблюдали резкое снижение функций D2R при активации дофаминергических нейронов (Squillace et al., 2014). На мышах линий Shank3 и Nlgn3-KO выявлено снижение активности дофаминергических нейронов в вентральном тегментуме, что вызывало поведенческий дефицит, включая нарушение со-

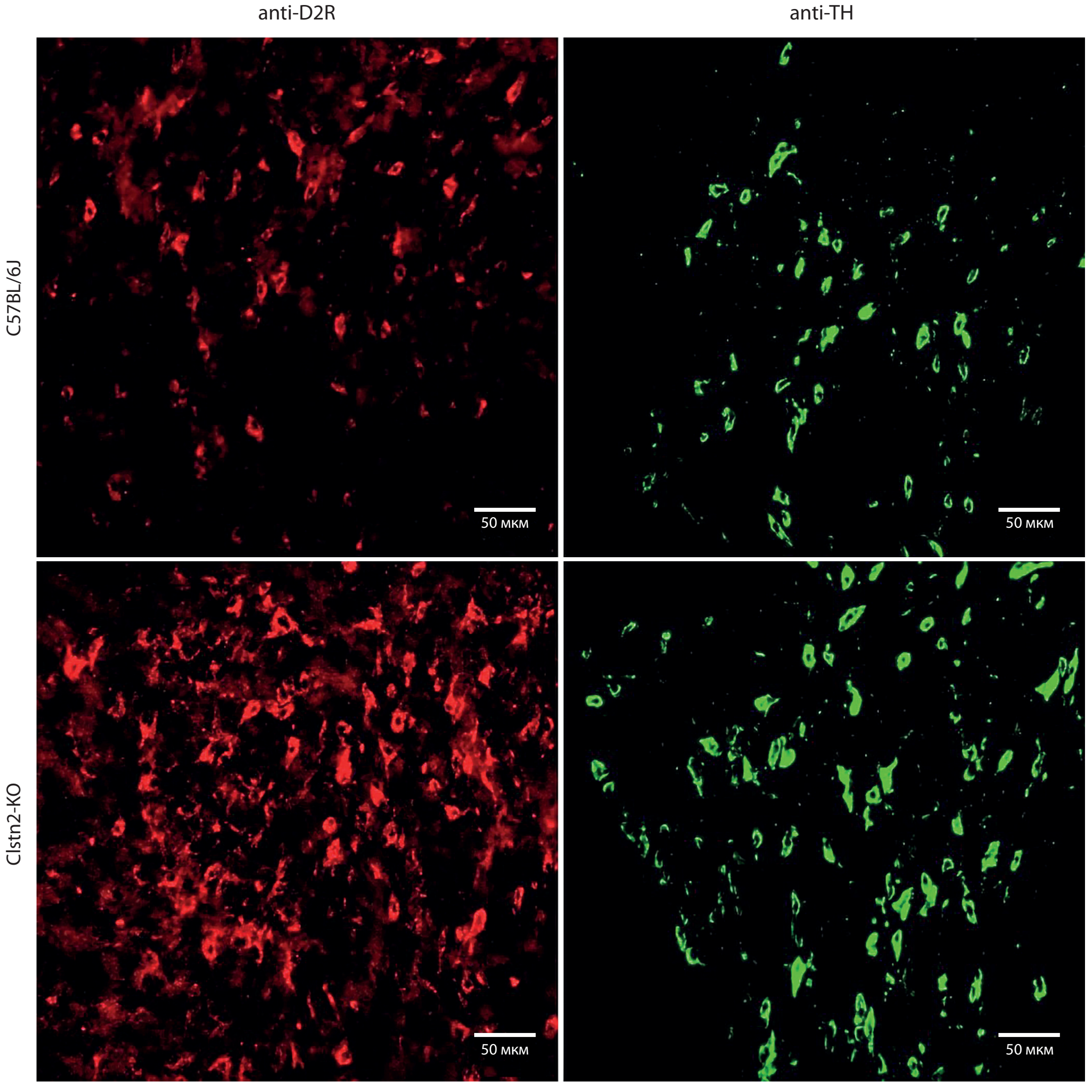

Рис. 2. Плотность нейронов, меченных антителами против дофаминового рецептора второго типа (anti-D2R-AF647) и тирозингидроксилазы (anti-TH-AF488), в вентральном тегментуме у самцов C57BL/6J и Clstn2-KO.

циальных предпочтений по сравнению с C57BL (Bariselli et al., 2016, 2018). В другой работе были исследованы две линии мышей, моделирующих разные формы РАС: BTBR и Fmr1-KO (Chao et al., 2020). Обнаружено общее снижение экспрессии тирозингидроксилазы в черной субстанции, вентральном тегментуме и стриатуме мышей BTBR по сравнению с мышами C57BL, однако не у линии Fmr1-KO (Chao et al., 2020). При изучении мышей линии TKO, являющейся другой моделью аутизма, тоже не было найдено изменений в дофаминергических нейронах в вентральном тегментуме (Tassan Mazzocco et al., 2021).

Таким образом, РАС часто, но не всегда, сопряжено с нарушениями дофаминергической системы в вентральном тегментуме. Изменение у мышей линии Clstn2-KO дофаминергической системы в вентральном тегментуме в сторону повышения числа нейронов, содержащих D2R и тирозингидроксилазу, – достаточно неожиданный результат. Описанная ранее гиперактивность мышей Clstn2-KO (Lipina et al., 2016), которая, возможно, проявилась в данной работе в тесте социально обусловленного предпочтения места повышенной частотой заходов в отсеки установки, может быть связана с повышенной плотностью нейронов с D2R. Как показано на гиперактивной линии мышей Coloboma, нокаут гена дофаминового рецептора D2R приводил к снижению двигательной активности по сравнению с контролем (Fan et al., 2010). Исходя из этого можно предположить, что установленное нами увеличение плотности нейронов с D2R в вентральном тегментуме мышей Clstn2-KO связано с повышенной активностью этих животных. Интересно также отметить исследование на человеке, где был обнаружен нуклеотидный полиморфизм по гену дофаминового рецептора второго типа, который можно рассматривать в качестве потенциального фактора риска развития не только РАС, но и синдрома дефицита внимания и гиперактивности (Mariggio et al., 2021).

Ранее в тесте социально обусловленного предпочтения места самцы мышей линии Disc1-Q31L с депрессивноподобным поведением, в отличие от Clstn2-KO мышей, предпочитали отсек, ассоциированный с изоляцией (Lipina et al., 2013). Можно предположить, что этот тест адекватно оценивает нарушения социального поведения, характерные для той или иной модели ментального расстройства. Действительно, депрессивно-подобное состояние, обусловленное дефицитом моноаминов, в том числе дофамина, характеризуется полным избеганием социальных контактов, что и продемонстрировано на линии Disc1-Q31L (Lipina et al., 2013). Наше исследование на Clstn2-KO мышах с аутистически-подобным поведением показало иной паттерн нарушения в данном тесте. Однако мы не можем полностью исключить влияние нарушенной пространственной долговременной памяти, наблюдаемой в тесте Морриса у мышей Clstn2-KO (Lipina et al., 2016), на социальное предпочтение, что необходимо рассмотреть в будущих исследованиях.

Полученные результаты могут свидетельствовать о снижении мотивации взаимодействия с конспецификом у мышей с нокаутом по гену *Clstn2*, поскольку самцы этой линии уделяли меньше времени партнеру в поведенческом тесте. Изменения были обнаружены также в вентральном тегментуме, который важен для процессов социального предпочтения (Gunaydin, Deisseroth, 2014). В этой структуре мозга было найдено повышенное число нейронов, экспрессирующих дофаминовые рецепторы второго типа и тирозингидроксилазу у мышей Clstn2-KO. Таким образом, можно предположить, что ген *Clstn2* имеет определенное значение в дофамин-зависимых процессах вознаграждения и двигательной активности, что, возможно, ассоциировано с изменениями плотности дофаминергических нейронов в вентральном тегментуме.

Заключение

Результаты данного исследования показывают, что у мышей с нокаутом по гену *Clstn2*, которых можно рассматривать как модельный объект для изучения расстройств аутистического спектра, имеет место изменение значимости социального вознаграждения. Кроме того, у них обнаружено повышенное число нейронов, экспрессирующих дофаминовые рецепторы второго типа и тирозингидроксилазу, в одной из важных структур мезолимбического дофаминергического пути – вентральном тегментуме, который является частью системы вознаграждения.

Список литературы / References

AlAyadhi L.Y., Hashmi J.A., Iqbal M., Albalawi A.M., Samman M.I., Elamin N.E., Bashir S., Basit S. High-resolution SNP genotyping platform identified recurrent and novel CNVs in autism multiplex families. *Neuroscience.* 2016;339:561-570. DOI 10.1016/j.neuro science.2016.10.030.

Autism spectrum disorder. In: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edn. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013;50-59.

Bariselli S., Hornberg H., Prevost-Solie C., Musardo S., Hatstatt-Burkle L., Scheiffele P., Bellone C. Role of VTA dopamine neurons and neuroligin 3 in sociability traits related to nonfamiliar conspecific interaction. *Nat. Commun.* 2018;9(1):3173. DOI 10.1038/s41467-018-05382-3.

Bariselli S., Tzanoulinou S., Glangetas C., Prevost-Solie C., Pucci L., Viguie J., Bezzi P., O’Connor E.C., Georges F., Luscher C., Bellone C. SHANK3 controls maturation of social reward circuits in the VTA. *Nat. Neurosci.* 2016;19(7):926-934. DOI 10.1038/nn. 4319.

Bello E.P., Mateo Y., Gelman D.M., Noain D., Shin J.H., Low M.J., Alvarez V.A., Lovinger D.M., Rubinstein M. Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nat. Neurosci.* 2011;14(8):1033-1038. DOI 10.1038/nn.2862.

Berrios J., Stamatakis A.M., Kantak P.A., McElligott Z.A., Judson M.C., Aita M., Rougie M., Stuber G.D., Philpot B.D. Loss of UBE3A from TH-expressing neurons suppresses GABA co-release and enhances VTA-NAc optical self-stimulation. *Nat. Commun.* 2016;7:10702. DOI 10.1038/ncomms10702.

Bourgeron T. A synaptic trek to autism. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2009; 19(2):231-234. DOI 10.1016/j.conb.2009.06.003.

Buxbaum J.D. Multiple rare variants in the etiology of autism spectrum disorders. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2009;11(1):35-43. DOI 10.31887/DCNS.2009.11.1/jdbuxbaum.

Canitano R. Epilepsy in autism spectrum disorders. *Eur. Child. Adolesc. Psychiatry.* 2007;16(1):61-66. DOI 10.1007/s00787-006-0563-2.

Chao O.Y., Pathak S.S., Zhang H., Dunaway N., Li J.S., Mattern C., Nikolaus S., Huston J.P., Yang Y.M. Altered dopaminergic pathways and therapeutic effects of intranasal dopamine in two distinct mouse models of autism. *Mol. Brain.* 2020;13(1):111. DOI 10.1186/s13041-020-00649-7.

Chen P., Hong W. Neural circuit mechanisms of social behavior. *Neuron.* 2018;98(1):16-30. DOI 10.1016/j.neuron.2018.02.026.

Fan X., Xu M., Hess E.J. D2 dopamine receptor subtype-mediated hyperactivity and amphetamine responses in a model of ADHD. *Neurobiol. Dis.* 2010;37(1):228-236. DOI 10.1016/j.nbd.2009.10.009.

Girault J.B., Piven J. The neurodevelopment of autism from infancy through toddlerhood. *Neuroimaging Clin. N. Am.* 2020;30(1):97-114. DOI 10.1016/j.nic.2019.09.009.

Gunaydin L.A., Deisseroth K. Dopaminergic dynamics contributing to social behavior. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2014;79: 221-227. DOI 10.1101/sqb.2014.79.024711.

Hart A.B., Engelhardt B.E., Wardle M.C., Sokoloff G., Stephens M., de Wit H., Palmer A.A. Genome-wide association study of *d*-amphetamine response in healthy volunteers identifies putative associations, including cadherin 13 (*CDH13*). *PLoS One.* 2012;7(8): e42646. DOI 10.1371/journal.pone.0042646.

Hintsch G., Zurlinden A., Meskenaite V., Steuble M., Fink-Widmer K., Kinter J., Sonderegger P. The calsyntenins – a family of postsynaptic membrane proteins with distinct neuronal expression patterns. *Mol. Cell. Neurosci.* 2002;21(3):393-409. DOI 10.1006/mcne.2002.1181.

Huguet G., Benabou M., Bourgeron T. The genetics of autism spectrum disorders. In: Sassone-Corsi P., Christen Y. (Eds.) A Time for Metabolism and Hormones. Research and Perspectives in Endocrine Interactions. Cham: Springer, 2016;101-130. DOI 10.1007/978-3-319-27069-2_11.

Jacobsen L.K., Picciotto M.R., Heath C.J., Mencl W.E., Gelernter J. Allelic variation of calsyntenin 2 (*CLSTN2*) modulates the impact of developmental tobacco smoke exposure on mnemonic processing in adolescents. *Biol. Psychiatry.* 2009;65(8):671-679. DOI 10.1016/j.biopsych.2008.10.024.

Karayannis T., Au E., Patel J.C., Kruglikov I., Markx S., Delorme R., Heron D., Salomon D., Glessner J., Restituito S., Gordon A., Rodriguez-Murillo L., Roy N.C., Gogos J.A., Rudy B., Rice M.E., Karayiorgou M., Hakonarson H., Keren B., Huguet G., Bourgeron T., Hoeffer C., Tsien R.W., Peles E., Fishell G. Cntnap4 differentially contributes to GABAergic and dopaminergic synaptic transmission. *Nature.* 2014;511(7508):236-240. DOI 10.1038/nature13248.

Klenova A.V., Volodin I.A., Volodina E.V., Ranneva S.V., Amstislavskaja T.G., Lipina T.V. Vocal and physical phenotypes of calsyntenin2 knockout mouse pups model early-life symptoms of the autism spectrum disorder. *Behav. Brain Res.* 2021;412:113430. DOI 10.1016/j.bbr.2021.113430.

Kohls G., Chevallier C., Troiani V., Schultz R.T. Social ‘wanting’ dysfunction in autism: neurobiological underpinnings and treatment implications. *J. Neurodev. Disord.* 2012;4(1):10. DOI 10.1186/1866-1955-4-10.

Kohls G., Yerys B.E., Schultz R.T. Striatal development in autism: repetitive behaviors and the reward circuitry. *Biol. Psychiatry.* 2014; 76(5):358-359. DOI 10.1016/j.biopsych.2014.07.010.

Lammel S., Hetzel A., Hackel O., Jones I., Liss B., Roeper J. Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron.* 2008;57(5):760-773. DOI 10.1016/j.neuron.2008.01.022.

Lan A., Stein D., Portillo M., Toiber D., Kofman O. Impaired innate and conditioned social behavior in adult C57Bl6/J mice prenatally exposed to chlorpyrifos. *Behav. Brain Funct.* 2019;15(1):2. DOI 10.1186/s12993-019-0153-3.

Laukka E.J., Lovden M., Herlitz A., Karlsson S., Ferencz B., Pantzar A., Keller L., Graff C., Fratiglioni L., Backman L. Genetic effects on old-age cognitive functioning: a population-based study. *Psychol. Aging.* 2013;28(1):262-274. DOI 10.1037/a0030829.

Lipina T.V., Fletcher P.J., Lee F.H., Wong A.H.C., Roder J.C. Disrupted-in-schizophrenia-1 Gln31Leu polymorphism results in social anhedonia associated with monoaminergic imbalance and reduction of CREB and *β*-arrestin-1,2 in the nucleus accumbens in a mouse model of depression. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38(3):423-436. DOI 10.1038/npp.2012.197.

Lipina T.V., Prasad T., Yokomaku D., Luo L., Connor S.A., Kawabe H., Wang Y.T., Brose N., Roder J.C., Craig A.M. Cognitive deficits in calsyntenin-2 deficient mice associated with reduced GABAergic transmission. *Neuropsychopharmacolocy.* 2016;41(3):802-810. DOI 10.1038/npp.2015.206.

Margolis E.B., Toy B., Himmels P., Morales M., Fields H.L. Identification of rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *PLoS One.* 2012;7(7):e42365. DOI 10.1371/journal.pone.0042365.

Mariggio M.A., Palumbi R., Vinella A., Laterza R., Petruzzelli M.G., Peschechera A., Gabellone A., Gentile O., Vincenti A., Margari L. *DRD1* and *DRD2* receptor polymorphisms: genetic neuromodulation of the dopaminergic system as a risk factor for ASD, ADHD and ASD/ADHD overlap. *Front. Neurosci.* 2021;15:705890. DOI 10.3389/fnins.2021.705890.

Marshall J.J., Mason J.O. Mouse vs man: organoid models of brain development & disease. *Brain Res.* 2019;1724:146427. DOI 10.1016/j.brainres.2019.146427.

Morales M., Margolis E.B. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 2017;18(2):73-85. DOI 10.1038/nrn.2016.165.

Panksepp J.B., Lahvis G.P. Social reward among juvenile mice. *Genes Brain Behav.* 2007;6(7):661-671. DOI 10.1111/j.1601-183X.2006.00295.x.

Paxinos G., Franklin K.B.J. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd Edn. Academic Press, 2001.

Ranneva S.V., Maksimov V.F., Korostyshevskaja I.M., Lipina T.V. Lack of synaptic protein, calsyntenin-2, impairs morphology of synaptic complexes in mice. *Synapse.* 2020;74(2):e22132. DOI 10.1002/syn.22132.

Ranneva S.V., Pavlov K.S., Gromova A.V., Amstislavskaya T.G., Lipina T.V. Features of emotional and social behavioral phenotypes of calsyntenin2 knockout mice. *Behav. Brain Res.* 2017;332:343-354. DOI 10.1016/j.bbr.2017.06.029.

Root D.H., Mejias-Aponte C.A., Zhang S., Wang H.L., Hoffman A.F., Lupica C.R., Morales M. Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat. Neurosci.* 2014;17:1543-1551. DOI 10.1038/nn.3823.

Sanchez-Catalan M.J., Kaufling J., George F., Veinante P., Barrot M. The antero-posterior heterogeneity of the ventral tegmental area. *Neuroscience.* 2014;282:198-216. DOI 10.1016/j.neuroscience.2014.09.025.

Saunders B.T., Richard J.M., Janak P.H. Contemporary approaches to neural circuit manipulation and mapping: focus on reward and addiction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2015;370(1677):20140210. DOI 10.1098/rstb.2014.0210.

Sawicka K., Hale C.R., Park C.Y., Fak J.J., Gresack J.E. FMRP has a cell-type-specific role in CA1 pyramidal neurons to regulate autism-related transcripts and circadian memory. *eLife.* 2019;8:e46919. DOI 10.7554/eLife.46919.

Sesack S.R., Grace A.A. Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35(1):27-47. DOI 10.1038/npp.2009.93.

Solie C., Girard B., Righetti B., Tapparel M., Bellone C. VTA dopamine neuron activity encodes social interaction and promotes reinforcement learning through social prediction error. *Nat. Neurosci.* 2022;25:86-97. DOI 10.1038/s41593-021-00972-9.

Squillace M., Dodero L., Federici M., Migliarini S., Errico F., Napolitano F., Krashia P., Di Maio A., Galbusera A., Bifone A., Scattoni M.L., Pasqualetti M., Mercuri N.B., Usiello A., Gozzi A. Dysfunctional dopaminergic neurotransmission in asocial BTBR mice. *Transl. Psychiatry.* 2014;4(8):e427. DOI 10.1038/tp.2014.69.

Supekar K., Kochalka J., Schaer M., Wakeman H., Qin S., Padmanabhan A., Menon V. Deficits in mesolimbic reward pathway underlie social interaction impairments in children with autism. *Brain.* 2018;141(9):2795-2805. DOI 10.1093/brain/awy191.

Tassan Mazzocco M., Guarnieri F.C., Monzani E., Benfenati F., Valtorta F., Comai S. Dysfunction of the serotonergic system in the brain of synapsin triple knockout mice is associated with behavioral abnormalities resembling synapsin-related human pathologies. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2021;105:110135. DOI 10.1016/j.pnpbp.2020.110135.

Yang G., Shcheglovitov A. Probing disrupted neurodevelopment in autism using human stem cell-derived neurons and organoids: an outlook into future diagnostics and drug development. *Dev. Dyn.* 2020;249(1):6-33. DOI 10.1002/dvdy.100.

Zhang Q., Wu H., Zou M., Li L., Li Q., Sun C., Xia W., Cao Y., Wu L. Folic acid improves abnormal behavior *via* mitigation of oxidative stress, inflammation, and ferroptosis in the BTBR T+ tf/J mouse model of autism. *J. Nutr. Biochem.* 2019;71:98-109. DOI 10.1016/j.jnutbio.2019.05.002.

Zhang S., Qi J., Li X., Wang H.L., Britt J.P., Hoffman A.F., Bonci A., Lupica C.R., Morales M. Dopaminergic and glutamatergic microdomains in a subset of rodent mesoaccumbens axons. *Nat. Neurosci.* 2015;18(3):386-392. DOI 10.1038/nn.3945.

Zoghbi H.Y. Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse? *Science.* 2003;302:826-830. DOI 10.1126/science.1089071.

Благодарности. Работа была частично профинансирована из бюджетного проекта № FWNR-2022-0023 Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-015-00162). Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023) и ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Авторы благодарят Т.Н. Игонину за обсуждение и помощь при подготовке текста статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.07.2022. После доработки 21.10.2022. Принята к публикации 21.10.2022. Опубликована онлайн 12.12.2022.