

# Коэкспрессия глутаматергических генов и генов аутистического спектра в гиппокампе у самцов мышей с нарушением социального поведения

И.Л. Коваленко , А.Г. Галямина, Д.А. Смагин, Н.Н. Кудрявцева

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

 e-mail: koir@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** В настоящее время существует представление о вовлеченности глутаматергической системы (ГГ) в механизмы развития аутизма. В предыдущих исследованиях нами было показано, что негативный социальный опыт, приобретенный в ежедневных межсамцовых конфронтациях, приводит к нарушениям в социальном поведении: снижению коммуникативности, нарушению социализации, появлению стереотипных форм поведения, которые могут рассматриваться как симптомы аутистического спектра. В связи с этим целью нашей работы было изучение с помощью транскриптомного анализа экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в функционирование глутаматергической системы, и генов, связанных с патологией аутизма (ГА), в гиппокампе. В эксперименте использовали животных с нарушениями социального поведения, вызванными повторным опытом социальных побед или поражений в ежедневных агонистических взаимодействиях. Для формирования групп животных с контрастными типами поведения использовали модель сенсорного контакта (хронического социального стресса). Полученные образцы мозга были секвенированы в ЗАО «Геноаналитика» (<http://genoanalytica.ru/>, Россия, Москва). Транскриптомный анализ показал, что у агрессивных животных снижается экспрессия генов *Shank3*, *Auts2*, *Ctnnd2*, *Nrxn2*, для которых показано участие в развитии аутизма, а также глутаматергического гена *Grm4*. В то же время у животных с негативным социальным опытом экспрессия ГА *Shank2*, *Nlgn2*, *Ptdch10*, *Reln*, *Arx* возрастает. При этом ГГ (*Grik3*, *Grm2*, *Grm4*, *Slc17a7*, *Slc1a4*, *Slc25a22*), за исключением гена *Grin2a*, повышают свою экспрессию. Корреляционный анализ выявил статистически значимую взаимосвязь измененной экспрессии ГГ и ГА. Полученные результаты, с одной стороны, могут служить подтверждением участия ГГ в патофизиологии развития симптомов аутистического спектра, с другой – свидетельствовать о коэкспрессии ГГ и ГА в гиппокампе, развивающейся под влиянием социальной среды. Так как большинство ГА, изменивших экспрессию в настоящем исследовании, являются генами, связанными с клеточным скелетом и внеклеточным матриксом, в частности участвующими в формировании синапсов, а ГГ, изменившие свою экспрессию, – генами, кодирующими субъединицы рецепторов, то можно предположить, что вовлечение ГГ в патофизиологию аутизма происходит на уровне рецепторов.

Ключевые слова: RNA-seq; аутизм; гиппокамп; гены аутизма; глутаматергические гены; социальный опыт.

**Для цитирования:** Коваленко И.Л., Галямина А.Г., Смагин Д.А., Кудрявцева Н.Н. Коэкспрессия глутаматергических генов и генов аутистического спектра в гиппокампе у самцов мышей с нарушением социального поведения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):191-199. DOI 10.18699/VJ20.42-o

## Co-expression of glutamatergic and autism-related genes in the hippocampus of male mice with disturbances of social behavior

I.L. Kovalenko , A.G. Galyamina, D.A. Smagin, N.N. Kudryavtseva

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

 e-mail: koir@bionet.nsc.ru

**Abstract.** There is a hypothesis of the involvement of the glutamatergic system in the development of autism. It has been shown that the chronic experience in daily intermale confrontations leads to disturbances in social behavior: a decrease in communicativeness, disturbances of socialization, emergence of stereotypical behaviors that can be considered as symptoms of the autistic spectrum disorders. So, the aim of this study was to investigate changes in the expression of glutamatergic (GG) and autism-related (GA) genes in the hippocampus of animals with impaired social behavior caused by repeated experience of social defeat or aggression in daily agonistic confrontations. To form groups of animals with contrasting behaviors, a model of sensory contact (chronic social stress) was used. The collected brain samples were sequenced at JSC Genoanalytica (<http://genoanalytica.ru/>, Moscow, Russia). Transcriptomic analysis re-

vealed a down-regulation of autism-related (*Shank3*, *Auts2*, *Ctnnd2*, *Nrxn2*) and glutamatergic (*Grm4*) genes in aggressive mice. At the same time, the expression of GA-related genes (*Shank2*, *Nlgn2*, *Ptcdh10*, *Reln*, *Arx*) and GG genes (*Grik3*, *Grm2*, *Grm4*, *Slc17a7*, *Slc1a4*, *Slc25a22*) excluding *Grin2a* was increased in defeated mice. Correlative analysis revealed a statistically significant association between GG and GA expression. These results can serve as a confirmation of the participation of the glutamatergic system in the pathophysiology of the autistic spectrum disorder.

Key words: RNA-seq; autism; hippocampus; glutamatergic genes; autism-related genes; social experience.

**For citation:** Kovalenko I.L., Galyamina A.G., Smagin D.A., Kudryavtseva N.N. Co-expression of glutamatergic and autism-related genes in the hippocampus of male mice with disturbances of social behavior. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(2):191-199. DOI 10.18699/VJ20.42-o (in Russian)

## Введение

Полагают, что выраженные нарушения в социальном поведении могут свидетельствовать об аутизме, который проявляется в детском возрасте и представляет собой нарушения развития нервной системы (Bauman, Kemper, 2005; Zablotsky et al., 2015). Согласно DSM-IV (American Psychiatric Association..., 1993), диагностические критерии аутизма включают триаду основных признаков: ухудшение социализации, под которой можно понимать способность индивида адекватно встраиваться в социум в новой обстановке, низкий уровень общительности и повторяющееся/стереотипное поведение. Хотя изучение близнецов свидетельствует о высокой наследуемости аутизма (Hallmayer et al., 2011), ни один ген не определен как единственная причина развития этого заболевания. Недавние геномные и генетические исследования показали, что сотни генетических вариантов, включающие общие и редкие взаимодействия генов, способствуют возникновению аутизма (Miles, 2011). Согласно различным базам данных (<http://omim.org/>, <http://www.genecards.org/>, <http://autism.mindspec.org/autdb/Welcome.do> <http://www.malacards.org/>), в базе генов аутизма насчитывается около 1500 генов, которые в той или иной мере вовлечены в механизмы аутизма. Многие гены, связанные с развитием головного мозга, – потенциальные гены-кандидаты аутизма, к ним относятся гены и семейства генов *Shank* (1–3), *Nlgn*, *Reln*, *Arx*, *Pcdh*, *Mecp2*, *Auts2* (Kleijer et al., 2014; Liu et al., 2015).

Литературные данные свидетельствуют об участии различных нейромедиаторных систем (например, серотонергической, дофаминергической) в развитии аутизма (Pavál, 2017). В последнее время большое внимание уделяется глутаматергической гипотезе аутизма (Rojas, 2014). В пользу этой теории говорит то, что глутамат является одним из наиболее распространенных нейротрансмиттеров в мозге млекопитающих, его рецепторы сосредоточены в областях мозга (мозжечок, гиппокамп, префронтальная кора), в которых обнаружены нейропатологические изменения при аутизме. Во взрослом мозге глутаматные рецепторы участвуют в обучении и памяти (Riedel et al., 2003; Simonui, 2010). Глутамат-опосредованные межнейронные взаимодействия также играют роль в формировании эмоционального поведения (Morgane et al., 2005; Faure et al., 2010). Показано, что для больных аутизмом характерен повышенный уровень глутамата в плазме крови, который может даже служить одним из биомаркеров этого заболевания (Zheng et al., 2016). У пациентов с аутизмом обнаруживаются и молекулярно-генетические повреждения глутаматергической системы (ГГ). Так, например, есть

сообщения о мутациях в генах глутаматного рецептора *GluR6* (Jamain et al., 2002), а также митохондриального переносчика глутамата (AGC1, ген *Slc25a12*) (Ramos et al., 2004). Изменения наблюдаются на уровне м-РНК, белков-транспортеров и рецепторов ГГ в посмертных образцах мозга больных аутизмом (Purcell et al., 2001). В целом некоторые исследователи связывают аутизм с дефицитом глутаматергической системы в мозге (Carlsson, 2015).

Ранее нами было показано, что в условиях хронического социального конфликта, вызванного повторным опытом побед или поражений в ежедневных межсамцовых конфронтациях (Kudryavtseva, 1991), у самцов мышей формируются не только повышенная тревожность, агрессивность или депрессивноподобное поведение, но и нарушения коммуникативного поведения и социального взаимодействия. Такие животные демонстрировали сниженную коммуникативность, а также стереотипные формы поведения (аутогруминг, вставание на задние лапы, кружение, разрывание и разбрасывание подстилки, повороты в прыжке и др.), что позволяет рассматривать данную модель как модель, воспроизводящую некоторые черты аутистического поведения (Коваленко, Кудрявцева, 2010), формирующиеся под влиянием социальной среды. При этом наши предыдущие исследования показали, что в этот процесс были вовлечены гены аутистического спектра, экспрессия которых изменялась под влиянием агонистических взаимодействий (Kudryavtseva et al., 2017).

В связи с этим целью настоящей работы было изучить у животных с альтернативным опытом социального поведения, позитивным и негативным, взаимосвязь изменения экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в функционирование ГГ, и генов, связанных с патологией аутизма (ГА) в гиппокампе. Выбор этой структуры головного мозга основан на многочисленных литературных данных о том, что гиппокамп непосредственно участвует в патогенетических процессах аутизма (DeLong, 1992), в развитии тревожных расстройств (Irle et al., 2010) и депрессии (Savitz, Drevets, 2009). Гиппокамп отвечает за эмоциональную саморегуляцию, обучаемость и память. А, как известно, нарушение именно этих функций часто наблюдается у людей, демонстрирующих симптомы аутистического спектра.

## Материалы и методы

**Животные.** Эксперименты проводили на самцах мышей линии C57BL/6J в возрасте 2.5 мес. и массой тела 26–28 г. Животные были привезены из питомника лабораторных животных Института биоорганической химии Российской академии наук (Пушино, Московская область). Экспе-

римент проводили в виварии конвенциональных животных Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Воду и корм (гранулы) животные получали в достаточном количестве. Световой режим был 12С:12Т. Все процедуры осуществляли в соответствии с международными правилами проведения экспериментов с животными (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes). Применяемые методики для изучения поведения у мышей были одобрены Научной комиссией (№ 9) Института цитологии и генетики СО РАН (Протокол № 613 от 24.03.2010).

**Поведенческие исследования.** Для формирования альтернативного опыта социального поведения у самцов мышей использовали модель сенсорного контакта (Kudryavtseva et al., 2014). Животных попарно помещали в экспериментальные клетки, разделенные пополам прозрачной перегородкой с отверстиями, позволявшей мышам видеть, слышать, воспринимать запахи друг друга (сенсорный контакт), но предотвращавшей физическое взаимодействие. Ежедневно во второй половине дня (15:00–17:00) убирали перегородку, что приводило к агонистическим взаимодействиям. В течение первых двух-трех дней тестов выявляли победителей (агрессоров/агрессивных животных) и особей, терпящих поражения (жертв) при взаимодействии с одним и тем же партнером. В дальнейшем ежедневно после теста побежденного самца пересаживали в новую клетку к незнакомому агрессивному партнеру, сидящему за перегородкой. Взаимодействие самцов прекращали, если интенсивные атаки со стороны нападающей особи во время агрессивных столкновений длились более трех минут, устанавливая между ними перегородку. В исследовании были взяты агрессивные животные с 20-дневным опытом побед (агрессоры) и с 20-дневным опытом поражений (жертвы). В качестве контроля использовали самцов, не имевших последовательного опыта агонистических взаимодействий. В каждой группе было по 14–16 животных.

Количественную оценку реакции экспериментальных животных на незнакомого партнера на нейтральной территории проводили при помощи теста «социальные взаимодействия» (Kudryavtseva et al., 2017). Как параметры социального поведения мы рассматривали *избегание* незнакомого партнера или же замирание при его подходе и *приближение* к партнеру: подходы, обнюхивания, следование за партнером; как параметры индивидуального поведения выделяли *стойки* – вставания на задние лапы, являющиеся показателем исследовательской активности, *аутогруминг*, служащий показателем смещенной активности и неадекватного стереотипного поведения, и *двигательную активность*, оценивающую интенсивность передвижений по клетке.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием пакета программ STATISTICA (ver. 8.0; StatSoft, Inc., 2001). Проверка нормальности распределения количественных признаков была проведена с использованием критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test). Поскольку выборки исследованных параметров поведения удовлетворяли гипотезе о нормальном распределении, были использованы методы параметриче-

ской статистики: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с фактором «группа» (контроль, агрессивные самцы, жертвы); последующее попарное сравнение показателей осуществляли с помощью LSD-теста Фишера.

При помощи корреляционного анализа по методу Пирсона мы исследовали взаимосвязь экспрессии ГТ и ГА. В экспериментальных поведенческих группах было по 10–12 животных.

**RNA-Seq-анализ** проводили с помощью ЗАО «Геноаналитика» (<http://genoanalytica.ru>, Москва). Методика анализа подробно описана ранее (Галямина и др., 2017).

Мы провели проверку результатов, сравнив их с данными В.М. Kadakkuzha (Kadakkuzha et al., 2015), представившими полный транскриптомный анализ генов в гиппокампе интактных мышей. Обнаружен высокий уровень корреляции (0.74 по Спирмену) между экспрессией генов аутизма и ГТ у контрольных особей в нашем эксперименте и у интактных животных в работе (Kadakkuzha et al., 2015), что может быть дополнительным доказательством адекватности применяемого метода. Кроме того, осуществляли кросс-верификацию результатов (Babenko et al., 2017) с данными, полученными в Стэнфордском университете (Zhang et al., 2014), и обнаружили значительную корреляцию между ними. Это доказывает, что метод транскриптомного анализа позволяет выявить происходящие в мозге молекулярные процессы.

В качестве верификации данных настоящего эксперимента использовали результаты, полученные нами ранее при помощи RT-PCR (Smagin et al., 2013), экспрессия которых, по методу RNA-Seq, была изменена. Было показано совпадение направленности и выраженности изменений экспрессии для генов, кодирующих белки серотонергической системы в ядрах шва среднего мозга, полученных при применении этих методов, что позволяет говорить о высокой надежности результатов этого исследования и о стабильности примененного метода.

Декапитацию всех трех групп экспериментальных животных проводили одновременно на следующий день после последней конфронтации. Гиппокамп извлекался одним исследователем в соответствии с анатомическим атласом мозга (Allen Mouse Brain Atlas; <http://mouse.brainmap.org/static/atlas>). Все образцы помещали в раствор RNAlater (LifeTechnologies, США) и хранили при температуре –70 °С до секвенирования. Проводили два типа сравнения: контроль–агрессоры и контроль–жертвы.

Для изучения изменений глутаматергической системы в гиппокампе животных с нарушенным социальным поведением были исследованы: гены переносчиков глутамата: *Slc17a6*, *Slc17a7* и *Slc17a8*; гены, кодирующие 1–4-ю субъединицы ионотропного AMPA-рецептора: *Gria1*, *Gria2*, *Gria3*, *Gria4*; гены, кодирующие 1–5-ю субъединицы ионотропного каинатного глутаматного рецептора: *Grik1*, *Grik2*, *Grik3*, *Grik4*, *Grik5*; гены, кодирующие 1, 2a, 2b, 2c, 2d, 3a, 3b субъединицы ионотропного NMDA-рецептора: *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c*, *Grin2d*, *Grin3a*, *Grin3b*; гены, кодирующие метаболитные рецепторы 1–8-го подтипов: *Grm1*, *Grm2*, *Grm3*, *Grm4*, *Grm5*, *Grm6*, *Grm7*, *Grm8*; гены, кодирующие 1 и 2-ю субъединицы глутаматного ионотропного рецептора дельта *Grid1* и *Grid2*; GRID2IP – белок, взаимодействующий с *Grid2*; гены

фермента глутаматдекарбоксилазы, метаболизирующей глутамат в ГАМК: *Gad1* и *Gad2*.

По генетическим базам данных OMIM (<http://omim.org/>), GeneCards (<http://www.genecards.org/>), MalaCards (<http://www.malacards.org/>) из 1.5 тыс. аннотированных генов было выбрано около 80 основных генов-кандидатов аутизма, которые в дальнейшем были рассмотрены в гиппокампе у контрольных особей и животных с нарушенным социальным поведением. При анализе сравнивали по три пробы от каждой группы животных.

## Результаты

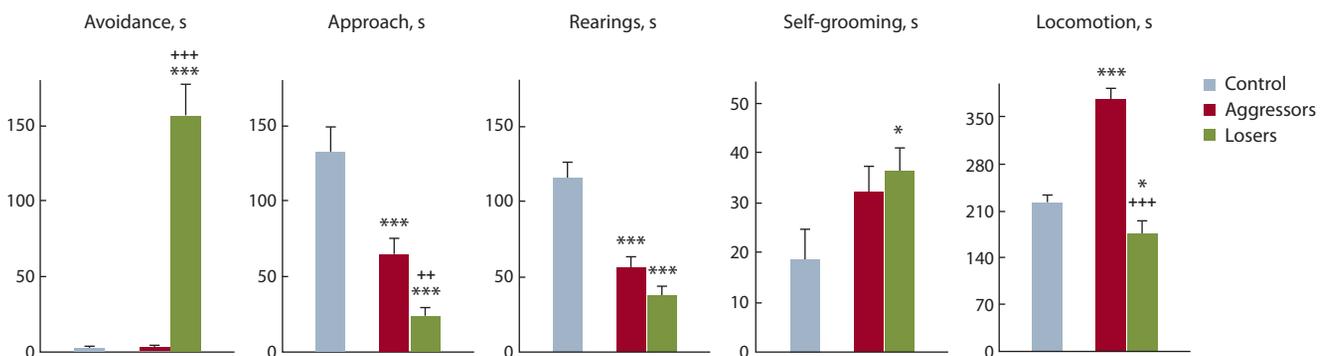
**Исследование нарушений социального поведения у самцов мышей под влиянием хронического социального стресса.** ANOVA выявил достоверное влияние фактора «группа» (контроль, агрессоры, жертвы) на избегание партнера ( $F(2.29) = 52.30, p < 0.001$ ), приближение ( $F(2.28) = 1097.4, p < 0.001$ ), время стоек ( $F(2.29) = 661.7, p < 0.001$ ), время двигательной активности ( $F(2.29) = 2549, p < 0.001$ ). Сравнение групп LSD-тестом Фишера (рис. 1) выявило увеличение времени избегания у жертв, по сравнению с контролем и агрессивными животными ( $p < 0.001$  для обеих групп). По сравнению с контролем у агрессоров и жертв также было показано снижение времени стоек ( $p < 0.001$  для обеих групп) и времени приближения к партнеру ( $p < 0.001$  для обеих групп). Кроме того, у жертв время приближения к партнеру было снижено и по сравнению с агрессивными животными ( $p < 0.006$ ). Выявлены увеличение времени двигательной активности у агрессоров ( $p < 0.001$ ) и снижение времени у жертв ( $p < 0.042$ ), по сравнению с контрольными животными. Время двигательной активности было значительно ниже у жертв, по сравнению с агрессорами ( $p < 0.001$ ). Кроме того, у жертв были увеличены число и время аутогруминга, по сравнению с контролем ( $p < 0.041, p < 0.034$  соответственно).

Таким образом, мы видим, что в тесте «социальные взаимодействия» жертвы активно избегали незнакомого партнера (тестера) на нейтральной территории. Они редко первыми подходили и проявляли интерес к незнакомому партнеру, в отличие от контроля. Контрольные животные целенаправленно следовали за партнером, обнюхивали его. У жертв также было снижено время стоек, рассмат-

риваемое нами как показатель исследовательской активности. Кроме того, у них было увеличено время демонстрации аутогруминга, который может оцениваться как признак стереотипного поведения. При этом отмечено, что у агрессивных животных были снижены параметры коммуникативности, что может свидетельствовать о нарушениях социального поведения. Большую часть 10-минутного теста (около 5–6 мин) агрессоры хаотично перемещались по клетке, не обращая внимания на партнера: общее время двигательной активности было значительно больше, чем у жертв, что может отражать развитие гиперактивности и, по-видимому, дефицит внимания. Ранее нами было показано, что в агонистических взаимодействиях агрессоры часто демонстрируют быстрые повороты в прыжке или же повторяющиеся повороты вокруг оси тела в тесте «перегородка» (Kudryavtseva, 2006), т. е. стереотипии у агрессивных мышей этой линии могут проявляться в другом тесте и другой форме. Таким образом, и у агрессоров, и у жертв в результате 20-дневных агонистических взаимодействий развиваются симптомы аутистического спектра.

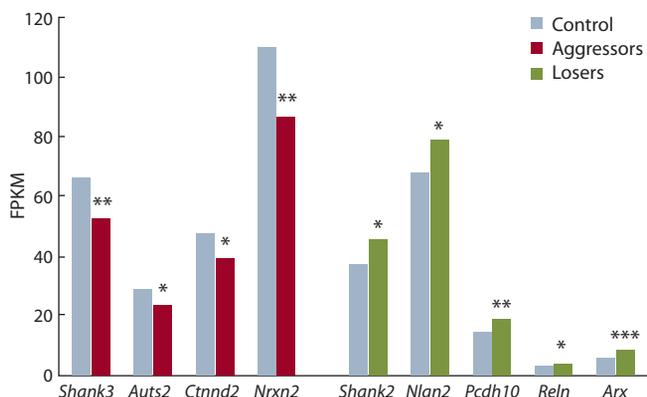
**Исследование экспрессии ГГ и ГА у самцов мышей с контрастными типами социального поведения.** В результате анализа данных RNA-Seq в гиппокампе обнаружено изменение экспрессии девяти генов-кандидатов аутизма (рис. 2, табл. 1). Так, у жертв выявлено увеличение экспрессии генов *Shank2* ( $p < 0.040$ ), *Nlgn2* ( $p < 0.047$ ), *Pcdh10* ( $p < 0.011$ ), *Reln* ( $p < 0.026$ ) и *Arx* ( $p < 0.0002$ ), по сравнению с уровнем экспрессии у контрольных животных. У агрессивных мышей в гиппокампе под влиянием повторного опыта агрессии в межсамцовых конфронтациях обнаружено снижение экспрессии генов *Shank3* ( $p < 0.010$ ), *Auts2* ( $p < 0.023$ ), *Ctnd2* ( $p < 0.020$ ), *Nrxn2* ( $p < 0.010$ ).

Были проанализированы изменения уровня экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в функционирование ГГ в гиппокампе мышей (см. табл. 1, рис. 3). Показано, что у мышей в гиппокампе под влиянием повторного опыта агрессии в межсамцовых конфронтациях снижена экспрессия гена *Grm4* ( $p < 0.023$ ), кодирующего метаботропный рецептор 4-го подтипа. У жертв было обнаружено снижение экспрессии гена *Grin2a* ( $p < 0.01$ ), кодирующего субъединицу 2а ионотропного NMDA-ре-



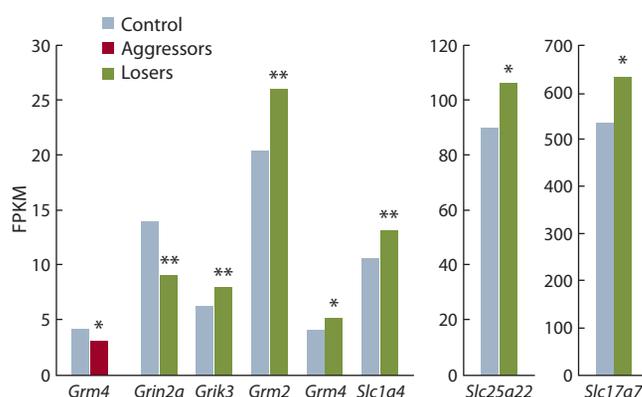
**Fig. 1.** Behavior of the aggressors and losers in the social interactions test.

\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  vs control; ++  $p < 0.01$ ; +++  $p < 0.001$  – losers vs aggressors.



**Fig. 2.** Change in GA expression in the hippocampus of aggressors and losers.

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  – vs control.



**Fig. 3.** Change in expression of GG in the hippocampus in mice with a disturbances of social behavior.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  – vs control.

**Table 1.** Differential expression GG and GA in hippocampus of aggressors and losers

Genes	Aggressors	Losers
Associated with autistic spectrum disorders		
<i>Shank3</i> , SH3 and Multiple Ankyrin Repeat Domains 3	▽▽	
<i>Auts2</i> , Activator of Transcription and Developmental Regulator	▽	
<i>Ctnnd2</i> , Catenin Delta 2	▽	
<i>Nrnx2</i> , Neurexin 2	▽	
<i>Shank2</i> , SH3 and Multiple Ankyrin Repeat Domains 2		△
<i>Nlgn2</i> , Neuroligin 2		△
<i>Pcdh10</i> , Protocadherin 10		△△
<i>Reln</i> , Reelin		△
<i>Arx</i> , Aristaless Related Homeobox		△△△
Involved in the functioning of the glutaminergic system		
<i>Grm4</i> , Glutamate Metabotropic Receptor 4	▽	△
<i>Grin2a</i> , Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A		▽▽
<i>Grik3</i> , Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 3		△△
<i>Grm2</i> , Glutamate Metabotropic Receptor 2		△△
<i>Slc17a7</i> , Solute Carrier Family 17 Member 7		△
<i>Slc1a4</i> , Solute Carrier Family 1 Member 4		△△
<i>Slc25a22</i> , Solute Carrier Family 25 Member 22		△

Note: Decreased expression: ▽ –  $p < 0.05$ ; ▽▽ –  $p < 0.01$ . Increased expression: △ –  $p < 0.05$ ; △△ –  $p < 0.01$ ; △△△ –  $p < 0.001$  vs control.

цептора, при этом повышалась экспрессия генов *Grm2* ( $p < 0.004$ ) и *Grm4* ( $p < 0.02$ ), кодирующих метаботропные рецепторы 2 и 4-го подтипов, гена *Grik3* ( $p < 0.003$ ), кодирующего субъединицу 3 ионотропного каинатного глутаматного рецептора, генов переносчиков глутамата *Slc17a7* ( $p < 0.051$ ), *Slc1a4* ( $p < 0.01$ ), *Slc25a22* ( $p < 0.028$ ).

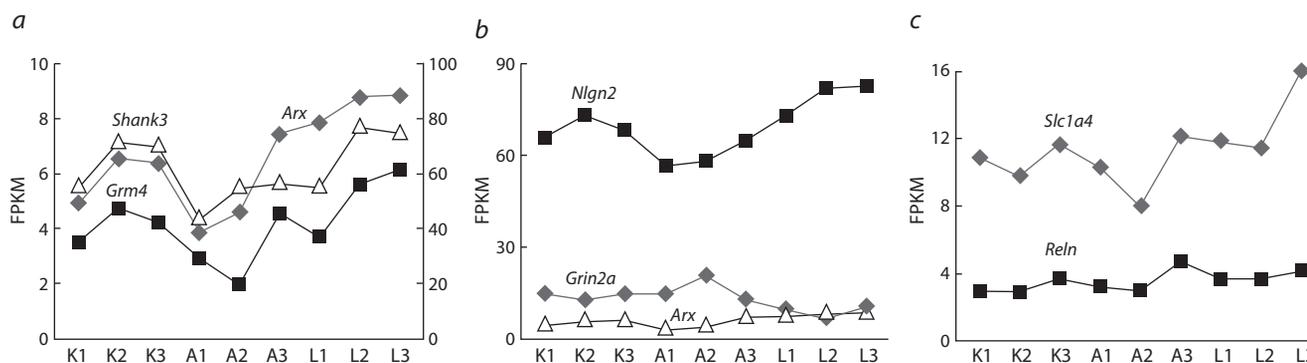
Результаты корреляционного анализа продемонстрировали высокий уровень корреляционной взаимосвязи между экспрессией ГГ и ГА у животных исследуемых групп (см. табл. 1 и 2). Корреляция между уровнями экс-

прессии ГА и ГГ показывает возможное участие глутаматергической системы в механизмах этого заболевания. Из ГА наибольшее число корреляций обнаружено для генов *Nlgn2*, *Pcdh10*, *Arx*, *Ctnnd2*, *Nrnx2*. В то же время уровень экспрессии гена *Reln* коррелирует только с уровнем экспрессии гена *Slc1a4*.

Значения экспрессии некоторых ГГ и ГА в единицах FPKM, между которыми установлена статистически значимая коррелятивная взаимосвязь, показаны на рис. 4. Большая часть генов демонстрирует положительную кор-

**Table 2.** Co-expression of GG and GA (Pearson coefficient value)

Gene	<i>Nlgn2</i>	<i>Pcdh10</i>	<i>Reln</i>	<i>Shank2</i>	<i>Shank3</i>	<i>Arx</i>	<i>Auts2</i>	<i>Ctndd2</i>	<i>Nrxn2</i>
<i>Grm2</i>	<b>0.761</b>	0.581	0.138	0.644	0.657	0.538	0.547	<b>0.692</b>	<b>0.668</b>
<i>Grm4</i>	<b>0.894</b>	<b>0.915</b>	0.537	<b>0.827</b>	<b>0.810</b>	<b>0.862</b>	0.602	<b>0.868</b>	<b>0.823</b>
<i>Grin2a</i>	<b>-0.825</b>	<b>-0.870</b>	-0.397	-0.643	-0.521	<b>-0.823</b>	-0.581	<b>-0.733</b>	<b>-0.867</b>
<i>Grik3</i>	<b>0.847</b>	<b>0.946</b>	0.597	<b>0.851</b>	<b>0.708</b>	<b>0.956</b>	<b>0.693</b>	<b>0.854</b>	<b>0.862</b>
<i>Slc1a4</i>	<b>0.677</b>	0.640	<b>0.696</b>	0.515	0.437	<b>0.714</b>	0.178	0.632	0.561
<i>Slc17a7</i>	<b>0.878</b>	<b>0.696</b>	0.231	<b>0.738</b>	<b>0.691</b>	<b>0.727</b>	<b>0.679</b>	<b>0.864</b>	<b>0.875</b>
<i>Slc25a22</i>	<b>0.922</b>	<b>0.918</b>	0.457	<b>0.906</b>	<b>0.792</b>	<b>0.940</b>	<b>0.802</b>	<b>0.933</b>	<b>0.935</b>



**Fig. 4.** Correlating GG and GA.

K1-3 – control animals; A1-3 – aggressors; L1-3 – losers. *a*, The right axis of ordinates is for the *Shank3* gene, the left one is *Arx* and *Grm4*.

реляцию друг с другом. Например, экспрессия *Grm4*, единственного гена, который изменил экспрессию и у жертв, и у агрессоров, положительно коррелирует с экспрессией ГА: *Shank3* ( $r = 0.810, p < 0.01$ ) и *Arx* ( $r = 0.862, p < 0.01$ ) (см. рис. 4, *a*). Экспрессия гена *Grin2a* демонстрирует отрицательную корреляцию с экспрессией ГА, например генов *Nlgn2* ( $r = -0.823, p < 0.01$ ) и *Arx* ( $r = -0.823, p < 0.01$ ) (см. рис. 4, *b*). Единственный ген, с которым коррелирует уровень экспрессии гена *Reln*, – это *Slc1a4* ( $r = 0.696, p < 0.05$ ) (см. рис. 4, *c*).

### Обсуждение

В наших предыдущих работах было обнаружено, что после 20 дней агонистических взаимодействий и проживания в условиях хронического социального конфликта у экспериментальных самцов нарушаются многие параметры социального поведения (Коваленко, Кудрявцева, 2010), схожие по симптоматике с заболеваниями аутистического спектра. Мы считаем, что в данном случае коморбидные аутистические симптомы развиваются на фоне других заболеваний. Это может быть тревожно-депрессивное состояние, возникающее вследствие хронического социального стресса у самцов мышей C57Bl/6 (Berton et al., 2006; Kudryavtseva et al., 2006) или каталепсии, развивающейся у животных СВА/Лас (Kudryavtseva et al., 2006), или же патологической агрессии (Kudryavtseva, 2006), формирующейся под влиянием повторного опыта агрессии. В литературе существуют данные, свидетельствующие, что коморбидность аутистических симптомов и расстройств настроения может быть следствием работы

одних и тех же генов, продукты которых вовлекаются в патофизиологические механизмы развития этих заболеваний (Ragunath et al., 2011).

В связи с этим помимо генов, для которых показано участие в развитии симптомов аутизма, мы исследовали также изменения экспрессии ГГ (транспортёров, рецепторов, ферментов катаболизма), так как известно, что эта нейромедиаторная система вовлечена в развитие данной патологии (Carlsson, 2015).

Мы выявили в гиппокампе изменение экспрессии семи ГГ: ген *Grin2a* кодирует NR2<sub>A</sub>-субъединицу NMDA-рецептора; *Grm2* и *Grm4* – метаболитные глутаматные рецепторы, mGluR2 и mGluR4 соответственно; *Grik3* – субъединицу каинатного рецептора, *Slc1a4* и *Slc17a7* – транспортёры глутамата Vglut1; *Slc25a22* – белок митохондриального переносчика глутамата. Изменили свою экспрессию 9 генов, ассоциированных с заболеваниями аутистического спектра: *Shank2*, *Shank3*, *Nlgn2*, *Reln*, *Arx*, *Nrxn2*, *Auts2*, *Ctndd2*, *Pcdh10*.

Белки семейства SHANK, известные также как ProSAP, являются строительными белками на возбуждающих глутаматергических синапсах. Так, ген *Shank2* кодирует белок, взаимодействующий на постсинаптической мембране с NMDA-рецептором, участвуя в синаптической глутаматергической передаче (Carlsson, 2015). Вовлечение в процесс развития аутизма генов *Shank* было впервые описано для *Shank3*. Например, было отмечено, что мыши, гетерозиготные по белку *Shank3* (*Shank3*<sup>+/-delta-C</sup>), демонстрировали низкий уровень социального распознавания и коммуникативности (Wang et al., 2011). В литературе было

показано, что для аутистических симптомов характерно снижение функции *Shank2* (Won et al., 2012). Нарушения в социальном поведении характерны как для пониженного (Peça et al., 2011), так и для повышенного (Moessner et al., 2007) уровня белка SHANK3. В нашей работе также обнаружены повышенный уровень экспрессии гена *Shank2* и сниженный уровень гена *Shank3*. Вероятно, нарушения в социальном поведении могут быть связаны с любыми изменениями в функционировании этих белков. Известно, что ProSAP2/Shank3 влияет на работу глутаматергических синапсов, взаимодействуя с внеклеточным С-концом нейролигинов (Meyer et al., 2004). Мутации в этом гене ухудшают синаптическую передачу (Arons et al., 2012). Следовательно, можно предположить, что влияние белков SHANK на развитие аутистических симптомов осуществляется через изменение функционирования глутаматергической системы.

Значительную часть ГА, изменивших свой уровень экспрессии в нашей работе, составляют гены клеточной адгезии: *Nlgn2* – нейролигин 2-го типа; *Pcdh10* – протокадерин; *Ctnd2* – δ-катенин; *Nrxn3* – нейрексин 3. Для всех этих белков многократными исследованиями было показано участие в формировании социального поведения и расстройств аутистического спектра. Известно, что изменение уровня белка NLGN2 может влиять на социальное и эмоциональное поведение (Maćkowiak et al., 2014). У аутистических больных обнаружены мутации в генах *Pcdh10* (Anitha et al., 2013), *Ctnd2* (Turner et al., 2015), *Nrxn3* (Vaags et al., 2012). Кроме того, продукты этих генов взаимодействуют с глутаматергической системой. Так, например, нейролигины вызывают кластеризацию Vglut-положительных синаптических пузырьков (Graf et al., 2004), без чего невозможно созревание и функционирование синапса. Правда, там же отмечено, что это характерно для нейролигина 1, а нейролигин 2 не располагается на одном синапсе с транспортером глутамата. Обнаружено, что в отсутствие нейролигинов снижается число Vglut1-положительных терминалей (Chih et al., 2005). Можно предположить, что на самом деле нейролигин взаимодействует непосредственно с NMDA-рецепторами, а переносчик Vglut1 выступает только в качестве маркера этих рецепторов. Что касается продукта гена *Pcdh10*, то установлено, что протокадерин локализуется на нейронах, формирующих глутаматергические AMPA и каинатные рецепторы (Puller, Naverkamp, 2011). Кроме того, показано, что у мышей, нокаутных по генам протокадерина, снижено число глутаматных транспортеров Vglut 1–2 (Chen et al., 2012), что также свидетельствует о взаимосвязи между протокадеринами и глутаматергической системой.

Продукты генов *Arx* и *Reln* (белок рилин) играют важную роль в механизмах пре- и постнатального нейрогенеза. Участие этих генов в патофизиологии аутизма является спорным: часть авторов приводят данные в пользу этого факта (Wall et al., 2009), в то время как другие опровергают его (Persico et al., 2001). В то же время обнаружена связь этих генов с функционированием глутаматергической системы. Так, известно, что мутации в гене *Arx* связаны с изменениями в глутаматергической системе у больных эпилепсией (Beguin et al., 2013), а белок рилин способен повышать мобильность рецепторов, содержащих NR2<sub>B</sub>-

субъединицу, снижая время ее пребывания в синапсе, таким образом, изменяя состав рецепторов в сторону преобладания NR2<sub>A</sub>-субъединицы (Groc et al., 2007).

Ген *Auts2* кодирует экспрессирующийся в головном мозге белок с неизвестной функцией, хотя предполагают, что он вовлечен в механизмы развития нервной системы (Oksenberg et al., 2013). Мутации в этом гене обнаружены у пациентов с аутистическими расстройствами (Liu et al., 2015). Показано, что *Auts2* экспрессируется на глутаматергических нейронах гиппокампа (Hori et al., 2014).

Так как большинство ГА, изменивших экспрессию в нашем исследовании, – гены, связанные с клеточным скелетом и внеклеточным матриксом, в частности участвующие в формировании синапсов, а ГГ – гены, кодирующие субъединицы рецепторов, то можно полагать, что изменение активности глутаматергической системы проявляется в аутистических симптомах.

Корреляционный анализ наших экспериментальных данных в целом выявил высокий уровень корреляции между экспрессией ГГ и ГА. Исключение составил ген *Reln*, коррелирующий только с геном *Slc1a4*. Характерно также, что везде обнаруживается положительная корреляция между генами, в то время как ген *Grin2a* отрицательно коррелирует с ГА. Однако снижение экспрессии *Grin2a*, продукт которого является субъединицей NMDA-рецептора, хорошо согласуется с литературными данными, связывающими развитие аутистических симптомов с дефицитом этих рецепторов (Lee et al., 2015). Экспрессия гена *Nlgn2* коррелирует с экспрессией всех ГГ, экспрессия генов *Pcdh10*, *Arx*, *Ctnd2*, *Nrxn2* – с экспрессией практически всех генов. Это позволяет предположить, что именно при помощи данных генов ГГ вовлекается в механизмы развития аутистического поведения. Можно видеть, что все наиболее коррелирующие гены, кроме *Arx*, – гены клеточной адгезии. Мы предполагаем, что продукты этих генов участвуют в соединении синапсов, в том числе глутаматергических, с клеточной мембраной. Таким образом, они вовлекаются в функционирование глутаматергической системы. Следовательно, изменение экспрессии этих генов изменяет уровень активности ГГ, что, в свою очередь, приводит к изменениям в социальном поведении, хотя нельзя исключить и обратный вариант взаимодействия.

## Заключение

Проведенное исследование подтвердило полученные ранее результаты, свидетельствующие о том, что под влиянием хронического социального конфликта у самцов мышей могут развиваться нарушения социального поведения, причем в этом процессе участвуют как гены, кодирующие белки, вовлеченные в функционирование глутаматергической системы, так и гены, связанные с патологией аутизма. Коэкспрессия этих генов позволяет говорить о вовлечении глутаматергической системы головного мозга в развитие патологии социального поведения. Полученные результаты могут служить доказательством того, что аутистические симптомы могут не только быть следствием генетических нарушений, но и развиваться в течение жизни индивидуума под влиянием стрессорных воздействий.

## Список литературы / References

- Гальямина А.Г., Коваленко И.Л., Смагин Д.А., Кудрявцева Н.Н. Изменение экспрессии генов нейромедиаторных систем в вентральной теменной области депрессивных мышей: данные RNA-Seq. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2017; 67(1):113-128. DOI 10.7868/S0044467717010063.  
[Galyamina A.G., Kovalenko I.L., Smagin D.A., Kudryavtseva N.N. Altered expression of neurotransmitters systems' genes in the ventral tegmental area of depressive male mice: data of RNA-Seq. Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatel'nosti imeni I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity. 2017;67(1):113-128. DOI 10.7868/S0044467717010063. (in Russian)]
- Коваленко И.Л., Кудрявцева Н.Н. Развитие симптомов аутистического спектра под влиянием хронического социального стресса у тревожных самцов мышей: эффекты диазепама. Психофармакол. биол. наркология. 2010;10(1-2):2624-2635.  
[Kovalenko I.L., Kudryavtseva N.N. Development of autistic spectrum symptoms under chronic social defeat stress in anxious male mice: effects of diazepam. Psikhofarmakologiya and Biologicheskaya Narkologiya = Psychopharmacology and Biological Narcology. 2010;10(1-2):2624-2635.]
- American Psychiatric Association. DSM-IV Draft Criteria. Washington, DC, American Psychiatric Press, 1993.
- Anitha A., Thanseem I., Nakamura K., Yamada K., Iwayama Y., Toyota T., Iwata Y., Suzuki K., Sugiyama T., Tsujii M., Yoshikawa T., Mori N. Protocadherin  $\alpha$  (PCDHA) as a novel susceptibility gene for autism. J. Psychiatry Neurosci. 2013;38(3):192-198. DOI 10.1503/jpn.120058.
- Arons M.H., Thynne C.J., Grabrucker A.M., Li D., Schoen M., Cheyne J.E., Boeckers T.M., Montgomery J.M., Garner C.C.J. Autism-associated mutations in ProSAP2/Shank3 impair synaptic transmission and neuroligin-mediated transsynaptic signaling. J. Neurosci. 2012;32(43):14966-14978. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2215-12.2012.
- Babenko V.N., Smagin D.A., Kudryavtseva N.N. RNA-Seq mouse brain regions expression data analysis: Focus on *ApoE* functional network. J. Integr. Bioinform. 2017;14(3):20170024. DOI 10.1515/jib-2017-0024.
- Bauman M.L., Kemper T.L. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. Int. J. Dev. Neurosci. 2005; 23(2-3):183-187. DOI 10.1016/j.jdevneu.2004.09.006.
- Beguín S., Crépel V., Aniksztejn L., Becq H., Pelosi B., Pallesi-Pocachard E., Bouamrane L., Pasqualetti M., Kitamura K., Cardoso C., Represa A. An epilepsy-related ARX polyalanine expansion modifies glutamatergic neurons excitability and morphology without affecting GABAergic neurons development. Cereb. Cortex. 2013; 23(6):1484-1494. DOI 10.1093/cercor/bhs138.
- Berton O., McClung C.A., Dileone R.J., Krishnan V., Renthal W., Russo S.J., Graham D., Tsankova N.M., Bolanos C.A., Rios M., Monteggia L.M., Self D.W., Nestler E.J. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. Science. 2006;311:864-886. DOI 10.1126/science.1120972.
- Carlsson M. Autism and glutamate. In: Fatemi S.H. (Ed.) The Molecular Basis of Autism. New York: Springer, 2015;243-256.
- Chen W.V., Alvarez F.J., Lefebvre J.L., Friedman B., Nwakeze C., Geiman E., Smith C., Thu C.A., Tapia J.C., Tasic B., Sanes J.R., Maniatis T. Functional significance of isoform diversification in the protocadherin-gamma gene cluster. Neuron. 2012;75(3):402-409. DOI 10.1016/j.neuron.2012.06.039.
- Chih B., Engelman H., Scheiffele P. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. Science. 2005;307:1324-1328. DOI 10.1126/science.1107470.
- DeLong G.R. Autism, amnesia, hippocampus, and learning. Neurosci. Biobehav. Rev. 1992;16:63-70.
- Faure A., Richard J.M., Berridge K.C. Desire and dread from the nucleus accumbens: cortical glutamate and subcortical GABA differentially generate motivation and hedonic impact in the rat. PLoS One. 2010;5(6):e11223. DOI 10.1371/journal.pone.0011223.
- Graf E.R., Zhang X., Jin S.X., Linhoff M.W., Craig A.M. Neuroligins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. Cell. 2004;119(7):1013-1026. DOI 10.1016/j.cell.2004.11.035.
- Groc L., Choquet D., Stephenson F.A., Verrier D., Manzoni O.J., Chavis P. NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein reelin. J. Neurosci. 2007;27(38):10165-10175. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1772-07.2007.
- Hallmayer J., Cleveland S., Torres A., Phillips J., Cohen B., Torigoe T., Miller J., Fedede A., Collins J., Smith K., Lotspeich L., Croen L.A., Ozonoff S., Lajonchere C., Grether J.K., Risch N. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. Arch. Gen. Psychiatry. 2011;68(11):1095-1102. DOI 10.1001/archgenpsychiatry.2011.76.
- Hori K., Nagai T., Shan W., Sakamoto A., Taya S., Hashimoto R., Hayashi T., Abe M., Yamazaki M., Nakao K., Nishioka T., Sakimura K., Yamada K., Kaibuchi K., Hoshino M. Cytoskeletal regulation by AUTS2 in neuronal migration and neurogenesis. Cell Rep. 2014;9(6):2166-2179. DOI 10.1016/j.celrep.2014.11.045.
- Irle E., Rühleder M., Lange C., Seidler-Brandler U., Salzer S., Dechent P., Weniger G., Leibing E., Leichsenring F. Reduced amygdala and hippocampal size in adults with generalized social phobia. J. Psychiatry Neurosci. 2010;35:126-131.
- Jamain S., Betancur C., Quash H. Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. Paris autism research international sibpair [PARIS] study. Mol. Psychiatry. 2002;7(3):302-310.
- Kadakkuzha B.M., Liu X.A., McCrate J., Shankar G., Rizzo V., Afinogenova A., Young B., Fallahi M., Carvalloza A.C., Raveendra B., Puthanveetil S.V. Transcriptome analyses of adult mouse brain reveal enrichment of lncRNAs in specific brain regions and neuronal populations. Front. Cell. Neurosci. 2015;9:63. DOI 10.3389/fncel.2015.00063.
- Kleijer K.T., Schmeisser M.J., Krueger D.D., Boeckers T.M., Scheiffele P., Bourgeron T., Brose N., Burbach J.P. Neurobiology of autism gene products: towards pathogenesis and drug targets. Psychopharmacology (Berl.). 2014;231(6):1037-1062. DOI 10.1007/s00213-013-3403-3.
- Kudryavtseva N.N. A sensory contact model for the study of aggressive and submissive behavior in male mice. Aggress. Behav. 1991; 17(5):285-291. DOI 10.1007/s00210-018-1580-7.
- Kudryavtseva N.N. The psychopathology of repeated aggression: a neurobiological aspect. In: Morgan J.P. (Ed.) Perspectives on the Psychology of Aggression. New York: Nova Science Publishers, 2006;35-64.
- Kudryavtseva N.N., Avgustinovich D.F., Bakshantovskaya I.V., Koryakina L.A., Alekseyenko O.V., Lipina T.V., Bondar N.P. Experimental studies of hereditary predisposition to the development of depression. In: Kalueff A. (Ed.) Animal Models of Biological Psychiatry. New York: Nova Science Publishers, 2006;75-95.
- Kudryavtseva N.N., Kovalenko I.L., Smagin D.A., Galyamina A.G., Babenko V.N. Abnormality of social behavior and dysfunction of autism related gene expression developing under chronic social defeat stress in male mice. Eur. Neuropsychopharm. 2017;27(4):S678-S679.
- Kudryavtseva N.N., Smagin D.A., Kovalenko I.L., Vishnivetskaya G.B. Protocol for repeated positive fighting experience in male mice: the tool for the study of movement disorders. Nature Protoc. 2014;9(11): 2705-2717.
- Lee E.J., Choi S.Y., Kim E. NMDA receptor dysfunction in autism spectrum disorders. Curr. Opin. Pharmacol. 2015;20:8-13. DOI 10.1016/j.coph.2014.10.007.
- Liu Y., Zhao D., Dong R., Yang X., Zhang Y., Tammimies K., Uddin M., Scherer S.W., Gai Z. De novo exon1 deletion of *AUTS2* gene in a patient with autism spectrum disorder and developmental delay: a case report and a brief literature review. Am. J. Med. Genet. A. 2015;167(6):1381-1385. DOI 10.1002/ajmg.a.37050.

- Maćkowiak M., Mordalska P., Wędzony K. Neuroligins, synapse balance and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol. Rep.* 2014;66: 830-835. DOI 10.1016/j.pharep.2014.04.011.
- Meyer G., Varoquaux F., Neeb A., Oschlies M., Brose N. The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin. *Neuropharmacology.* 2004;47:724-733. DOI 10.1016/j.neuropharm.2004.06.023.
- Miles J.H. Autism spectrum disorders, a genetics review. *Genet. Med.* 2011;13(4):278-294. DOI 10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba.
- Moessner R., Marshall C.R., Sutcliffe J.S., Skaug J., Pinto D., Vincent J., Zwaigenbaum L., Fernandez B., Roberts W., Szatmari P., Scherer S.W. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81:1289-1297. DOI 10.1086/522590.
- Morgane P.J., Galler J.R., Mokler D.J. A review of systems and networks of the limbicforebrain/limbicmidbrain. *Prog. Neurobiol.* 2005;75(2):143-160. DOI 10.1016/j.pneurobio.2005.01.001.
- Oksenberg N., Stevison L., Wall J.D., Ahituv N. Function and regulation of *AUTS2*, a gene implicated in autism and human evolution. *PLoS Genet.* 2013;9(1):e1003221. DOI 10.1371/journal.pgen.1003221.
- Pavál D.A. Dopamine hypothesis of autism spectrum disorder. *Dev. Neurosci.* 2017;39(5):355-360. DOI 10.1159/000478725.
- Peça J., Feliciano C., Ting J.T., Wang W., Wells M.F., Venkatraman T.N., Lascola C.D., Fu Z., Feng G. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature.* 2011; 472(7344):437-442. DOI 10.1038/nature09965.
- Persico A.M., D'Agruma L., Maiorano N., Totaro A., Militerni R., Bravaccio C., Wassink T.H., Schneider C., Melmed R., Trillo S., Montecchi F., Palermo M., Pascucci T., Puglisi-Allegra S., Reichelt K.L., Conciatori M., Marino R., Quattrocchi C.C., Baldi A., Zelante L., Gasparini P., Keller F.; Collaborative Linkage Study of Autism. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor or predisposing to autistic disorder. *Mol. Psychiatry.* 2001;6(2):150-159. DOI 10.1038/sj.mp.4000850.
- Puller C., Haverkamp S. Cell-type-specific localization of protocadherin  $\beta 16$  at AMPA and AMPA/Kainate receptor-containing synapses in the primate retina. *J. Comp. Neurol.* 2011;519(3):467-479. DOI 10.3233/DMA-2012-0917.
- Purcell A.E., Jeon O.H., Pevsner J. The abnormal regulation of gene expression in autistic brain tissue. *J. Autism Dev. Disord.* 2001;31(6): 545-549.
- Ragunath P.K., Chitra R., Mohammad S., Abhinand P.A. A systems biological study on the comorbidity of autism spectrum disorders and bipolar disorder. *Bioinformatics.* 2011;7(3):102-106.
- Ramos N., Reichert J.G., Smith C.J., Silverman J.M., Bespalova I.N., Davis K.L., Buxbaum J.D. Linkage and association of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 gene with autism. *Am. J. Psychiatry.* 2004;161(4):662-669. DOI 10.1176/appi.ajp.161.4.662.
- Riedel G., Platt B., Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav. Brain Res.* 2003;140(1-2):1-47.
- Rójas D.C. The role of glutamate and its receptors in autism and the use of glutamate receptor antagonists in treatment. *J. Neural. Transm. (Vienna).* 2014;121(8):891-905. DOI 10.1007/s00702-014-1216-0.
- Savitz J.B., Drevets W.C. Imaging phenotypes of major depressive disorder: genetic correlates. *Neuroscience.* 2009;164:300-330. DOI 10.1016/j.neuroscience.2009.03.082.
- Simonyi A., Schachtman T.R., Christoffersen G.R. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonism in learning and memory. *Eur. J. Pharmacol.* 2010;639(1-3):17-25. DOI 10.1016/j.ejphar.2009.12.039.
- Smagin D.A., Boyarskikh U.A., Bondar N.P., Filipenko M.L., Kudryavtseva N.N. Reduction of serotonergic gene expression in the mid-brain raphe nuclei under positive fighting experience. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2013;4(10B):36-44. DOI 10.4236/abb.2013.410A3005.
- Turner T.N., Sharma K., Oh E.C., Liu Y.P., Collins R.L., Sosa M.X., Auer D.R., Brand H., Sanders S.J., Moreno-De-Luca D., Pihur V., Plona T., Pike K., Soppet D.R., Smith M.W., Cheung S.W., Martin C.L., State M.W., Talkowski M.E., Cook E., Huganir R., Katsanis N., Chakravarti A. Loss of  $\delta$ -catenin function in severe autism. *Nature.* 2015;520(7545):51-56. DOI 10.1038/nature14186.
- Vaags A.K., Lionel A.C., Sato D., Goodenberger M., Stein Q.P., Curran S., Ogilvie C., Ahn J.W., Drmic I., Senman L., Chrysler C., Thompson A., Russell C., Prasad A., Walker S., Pinto D., Marshall C.R., Stavropoulos D.J., Zwaigenbaum L., Fernandez B.A., Fombonne E., Bolton P.F., Collier D.A., Hodge J., Roberts W., Szatmari P., Scherer S.W. Rare deletions at the neurexin 3 locus in autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;90(1):133-141. DOI 10.1016/j.ajhg.2011.11.025.
- Wall D.P., Esteban F.J., Deluca T.F., Huyck M., Monaghan T., Velez de Mendizabal N., Goñi J., Kohane I.S. Comparative analysis of neurological disorders focuses genome-wide search for autism genes. *Genomics.* 2009;93(2):120-129. DOI 10.1016/j.ygeno.2008.09.015.
- Wang X., McCoy P.A., Rodriguiz R.M., Pan Y., Je H.S., Roberts A.C., Kim C.J., Berrios J., Colvin J.S., Bousquet-Moore D., Lorenzo I., Wu G., Weinberg R.J., Ehlers M.D., Philpot B.D., Beaudet A.L., Wetsel W.C., Jiang Y.H. Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. *Hum. Mol. Genet.* 2011;20:3093-3108. DOI 10.1093/hmg/ddr212.
- Won H., Lee H.R., Gee H.Y., Mah W., Kim J.I., Lee J., Ha S., Chung C., Jung E.S., Cho Y.S., Park S.G., Lee J.S., Lee K., Kim D., Bae Y.C., Kaang B.K., Lee M.G., Kim E. Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. *Nature.* 2012;486:261-265. DOI 10.1038/nature11208.
- Zablotsky B., Black L.I., Maenner M.J., Schieve L.A., Blumberg S.J. Estimated prevalence of autism and other developmental disabilities following questionnaire changes in the 2014 national health interview survey. *Natl. Health Stat. Report.* 2015;87:1-20.
- Zhang Y., Chen K., Sloan S.A., Bennett M.L., Scholze A.R., O'Keefe S., Phatnani H.P., Guarnieri P., Caneda C., Ruderisch N., Deng S., Liddelow S.A., Zhang C., Daneman R., Maniatis T., Barres B.A., Wu J.Q. An RNA-sequence and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 2014;34(36): 11929-11947. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014.
- Zheng C., Zhu Q., Liu X., Huang X., He C., Jiang L., Quan D., Zhou X., Zhu Z. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on proliferation, neurotrophic function and migration of Schwann cells *in vitro*. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2016;10(5):428-436. DOI 10.1002/term.175.

#### ORCID ID

I.L. Kovalenko orcid.org/0000-0002-6672-1287  
A.G. Galyamina orcid.org/0000-0001-6101-2521  
D.A. Smagin orcid.org/0000-0002-4017-7287  
N.N. Kudryavtseva orcid.org/0000-0003-2418-1750

**Acknowledgements.** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-04-00140, and State Budgeted Projects 0324-2019-0041 and 0324-2019-0041-C-01.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received July 5, 2019. Revised October 17, 2019. Accepted November 8, 2019. Published online February 19, 2020.