

## 1. Streszczenie w języku polskim

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

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

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

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

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

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

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

## 2. Streszczenie w języku angielskim

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

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

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

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

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

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