

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и
генетики Сибирского отделения Российской академии наук»
(ИЦиГ СО РАН)**

На правах рукописи

РЕШЕТНИКОВ ВАСИЛИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**Изменение транскриптома и паттерна распределения
эпигенетической модификации H3K4me3 под действием
раннего постнатального стресса в префронтальной коре у
самцов мышей**

1.5.7 - генетика

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Бондарь Наталья Петровна

Новосибирск - 2023

Оглавление

Оглавление	2
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
АДГ – антидиуретический гормон.....	5
ГГНС- гипоталамо-гипофизарная-надпочечниковая-система	5
ЦНС – центральная нервная система	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Цели и задачи исследования.....	7
Научная новизна работы.....	8
Теоретическая и научно-практическая ценность работы	9
Положения, выносимые на защиту:.....	9
Структура и объем работы	12
Благодарности.....	12
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Молекулярные механизмы ответа на стресс	13
1.2. Особенности постнатального периода развития	16
1.3. Ранний постнатальный стресс у людей	18
1.4. Модели раннего постнатального стресса на животных	20
1.5. Структурные и функциональные изменения в головном мозге под действием раннего постнатального стресса.....	25
1.6. Возможные молекулярные механизмы эффектов раннего постнатального стресса	29
1.6.1. Метилирование ДНК.....	29
1.6.2. Модификации гистонов	30
1.6.3. Некодирующие РНК	31
1.7. Молекулярные изменения, вызванные ранним постнатальным стрессом.....	32
1.7.1. Молекулярные изменения в генах, связанных с ГГНС	33
1.7.2. Влияние на нейротрофический фактор мозга.....	36
1.7.3. Влияние на процессы миелинизации	39
1.7.4. Влияние на глутаматергическую и ГАМК-эргическую системы.....	40
1.8. Влияние раннего постнатального стресса на стресс-реактивность	42
1.9. Модели хронического стресса во взрослом возрасте на животных	45
1.10. Заключение по литобзору.....	47

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	49
2.1. Материалы, использованные в работе.....	49
2.2. Животные	50
2.3. Экспреиментальный дизайн	50
2.4. Процедура раннего постнатального стресса.....	53
2.5. Хронический стресс социальных поражений	54
2.6. Поведенческие тесты	55
2.5.1. Тест «социальное взаимодействие»	55
2.5.2. Тест вынужденного плавания (тест Порсолта)	56
2.5.3. Тест «Открытое поле»	57
2.5.4. Тест приподнятого крестообразного лабиринта	57
2.5.5. Тест распознавания нового объекта (novel object recognition)	57
2.5.6. Тест водного лабиринта Морриса (Morris' water maze test).....	58
2.7. Иммуноферментный анализ уровня кортикостерона	59
2.8. Хроматографический анализ уровня кортикостерона	60
2.9. Выделение префронтальной коры головного мозга для молекулярных исследований	61
2.10. Выделение РНК	61
2.11. Реакция обратной транскрипции	62
2.12. Оценка экспрессии генов с помощью количественного ПЦР анализа.....	63
2.13. Иммунопреципитация хроматина с использованием антител к H3K4me3.....	66
2.14. Приготовление библиотек для секвенирования	69
2.14.1. Подготовка ДНК-библиотек из иммунопреципитатов	69
2.14.2. Подготовка библиотек для RNA-seq	72
2.15. Статистическая обработка данных	73
2.16. Биоинформатический анализ данных секвенирования	74
2.16.1. Анализ данных RNA-seq.....	74
2.16.2. Анализ данных ChIP-seq.....	75
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	76
3.1. Влияние раннего постнатального стресса на ГГНС у самцов мышей различных возрастов.....	76
3.4. Влияние раннего постнатального стресса на поведение взрослых животных	77
3.5. Влияние раннего постнатального стресса на обучение и память	80
3.5.1. Тест водного лабиринта Морриса	80
3.5.2. Тест на распознавание нового объекта.....	81

3.6. Влияние раннего постнатального стресса на транскриптом префронтальной коры головного мозга взрослых самцов мышей	84
3.7. Влияние раннего постнатального стресса на распределения метки активного хроматина H3K4me3 во префронтальной коре с помощью метода ChIP-seq.....	88
3.8. Влияние раннего постнатального стресса на чувствительность к стрессу во взрослом возрасте	94
3.8.1. Транскриптомные изменения после воздействия стресса социальных поражений ...	95
3.8.2. Влияние стресса социальных поражений на профиль H3K4me3	102
3.8.3. Взаимосвязь плотности распределения H3K4me3 в промоторе с экспрессией генов	106
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	111
4.1. Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период не влияет на базальную активность ГГНС у самцов мышей различных возрастов.....	111
4.2. Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит к снижению двигательной активности и нарушению пространственной памяти у взрослых самцов	114
4.3. Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит к выраженным изменениям в экспрессии генов в префронтальной коре у взрослых самцов	115
4.5. Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит к умеренным изменениям профиля H3K4me3 в префронтальной коре у взрослых самцов	118
4.6. Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит к повышению чувствительности к хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте	121
4.7. Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период влияет на изменение профиля H3K4me3 в префронтальной коре взрослых самцов после воздействия хронического стресса социальных поражений	131
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	135
ВЫВОДЫ	137
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	138
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	182
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	183
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	184
ПРИЛОЖЕНИЕ 4	185

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДГ – антидиуретический гормон

АКТГ - адренотропный гормон

ДО – длительное отделение

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены

ГГНС- гипоталамо-гипофизарная-надпочечниковая-система

ГАМК - γ -Аминомасляная кислота

ГР – глюкокортикоидные рецепторы

К – контрольная группа

КРФ - кортикотропин-рилизинг-фактор

КСГ - кортикостероидсвязывающий глобулин

МР – минералокортикоидные рецепторы

ОДО – однократное длительное отделение

ОМГ- ограниченные условия материала гнездования

ПВЯ - паравентрикулярные ядра гипоталамуса

ПД- постнатальный день

СС –социальный стресс

ДО+СС – группа, с сочетанием стрессов ДО и СС

ЦНС – центральная нервная система

НЗК₄me₃ - триметилирование гистона НЗ по 4-му лизину

AMPA - ионотропный глутаматный рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты

ChIP-seq – иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием

LTP - долговременная потенция

LTD – долговременная депрессия

NMDAR-ионотропный глутаматный рецептор N-метил-D-аспартата

PolyI:C - полиинозиновая: полицитидиловая кислота

ВВЕДЕНИЕ

Пренатальный и постнатальный период являются важными периодами в жизни каждого индивида (Lupien et al., 2009b). Во время пренатального периода запускается интенсивное нейроэндокринное развитие мозговых структур и формирование нейрональных связей, необходимых для нормального развития организма. В постнатальный период продолжается развитие некоторых структур мозга, таких как, гиппокамп и префронтальная кора, а также процессы развития синаптических связей, миелинизации нервных волокон и окончательное формирование нейрональных сетей.

В эти периоды особенную важность имеет функционирование гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), играющей ключевую роль в регуляции стрессорного ответа. В постнатальный период наблюдается снижение активности ГГНС в ответ на внешние раздражители, поэтому этот период называется гипочувствительным к стрессу (stress hyporesponsive period) (Sapolsky and Meaney, 1986a). На молекулярном уровне это сопровождается снижением экспрессии кортикотропин-рилизинг-фактора (КРФ) и, следовательно, уменьшением содержания глюкокортикоидных гормонов в крови. Этот период играет важную роль в развитии организма, поскольку низкий уровень глюкокортикоидов обеспечивает правильное завершение развития мозговых структур.

Однако хронические стрессовые воздействия в этот период способны привести к увеличению уровня глюкокортикоидных гормонов в крови. У людей такие стрессы могут быть вызваны потерей или длительной разлукой с родителями, болезнью, насилием, жестоким обращением в семье, лишением пищи и жилья (Evans and Kim, 2013). У животных такие стрессы связаны с нарушением контакта с матерью, ограниченными условиями гнездования, нехваткой воды и пищи (Lyons et al., 2010). Стрессовые воздействия в этот период способны привести к нарушению в развитии мозга и их последствия могут наблюдаться на протяжении всей жизни индивида. В частности, было

показано, что неблагоприятные жизненные события в ранний период жизни увеличивают риск возникновения различных проблем с психическим здоровьем, которые развиваются в более позднем возрасте. Среди таких проблем рассматривают снижение когнитивных способностей, повышенную реакцию на стресс, расстройства настроения, повышенную тревожность. В регуляцию этих процессов активно вовлечены такие структуры мозга как префронтальная кора, передняя поясная извилина и гиппокамп (для обзора см. (Lupien et al., 2009b; Teicher et al., 2016)).

Эпигенетические изменения в регуляции экспрессии генов в настоящее время рассматриваются в качестве одного из возможных механизмов, которые приводят к отставленным во времени эффектам. Эти механизмы включают посттрансляционную модификацию гистоновых белков, а также химические модификации отдельных нуклеотидов, которые изменяют структуру хроматина, и, следовательно, доступность ДНК для регуляторов транскрипции. В более широком смысле, эти механизмы также включают регуляцию транскрипции и трансляции с помощью некодирующих РНК. Однако, несмотря на интенсивное изучение эффектов раннего постнатального стресса, молекулярные механизмы, приводящие к отставленным поведенческим нарушениям, все еще остаются мало исследованными (Lupien et al., 2009b; Teicher and Samson, 2016; Teicher et al., 2016). Поэтому выяснение молекулярных механизмов отсроченного влияния неблагоприятных событий в ранний постнатальный период является приоритетной задачей на сегодняшний день. Исследования на животных моделях стресса в раннем возрасте позволяют выяснить молекулярные механизмы, лежащие в основе отставленных эффектов такого стресса, и разработать адекватные методы коррекции нарушений.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы было выявить отставленные эффекты раннего постнатального стресса на поведение взрослых мышей и определить

молекулярные последствия данного стресса для префронтальной коры головного мозга на уровне экспрессии генов и распределения гистоновой модификации H3K4me3 как в нормальных условиях развития, так и после предъявления хронического стресса социальных поражений во взрослом возрасте.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить влияние раннего постнатального стресса на индивидуальное и социальное поведение, процессы обучения и памяти у взрослых животных.
2. Определить отсроченное влияние постнатального стресса на транскриптом префронтальной коры головного мозга взрослых самцов мышей.
3. Определить отсроченные эффекты раннего постнатального стресса на полногеномное распределение модификации хроматина H3K4me3 (ChIP-seq) в префронтальной коре головного мозга взрослых самцов мышей.
4. Оценить влияние раннего постнатального стресса на чувствительность к социальному стрессу во взрослом возрасте по поведенческим показателям, изменениям в транскриптом и распределении гистоновой модификации H3K4me3 в префронтальной коре головного мозга взрослых самцов мышей.

Научная новизна работы

В данной работе впервые был проведен комплексный анализ отставленных эффектов стресса в раннем возрасте на транскриптом и профиль гистоновой модификации H3K4me3 в префронтальной коре головного мозга взрослых самцов мышей. Были найдены значительные изменения в уровне транскрипции генов и лишь небольшие изменения в

уровне H3K4me3 в отдельных районах генома, которые не связаны с выявленными изменениями в экспрессии генов.

Кроме того, мы впервые оценили влияние раннего постнатального стресса на чувствительность к хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте на поведенческом уровне, на уровне экспрессии генов (транскриптом) и распределения гистоновой модификации H3K4me3 в префронтальной коре головного мозга. Сочетание двух стрессов усиливает изменения в экспрессии ряда генов, связанных с циркадными ритмами, а также изменяет паттерн распределения H3K4me3 в их промоторах.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы

Использованный в данной работе подход позволяет выявить новые гены-мишени и генные пути, изменяющиеся под действием раннего постнатального стресса, хронического стресса социальных поражений и их комбинации, что в сочетании с анализом их регуляторных районов дает более целостное представление об отсроченных эффектах раннего постнатального стресса. Эти результаты вносят вклад в понимание фундаментальных основ молекулярных механизмов стресса в ранний период жизни и его роли в формировании последующей гиперчувствительности к стрессу во взрослом возрасте. Кроме того, результаты могут быть использованы для выбора и разработки терапевтических препаратов, корректирующих отставленные последствия стресса в раннем возрасте.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ранний постнатальный стресс негативно влияет на активность глутаматной системы в префронтальной коре головного мозга взрослых самцов мышей C57BL/6 и связанных с ней процессов обучения и памяти – снижает экспрессию генов факторов синаптической пластичности *Pclo* и *Bdnf* и генов *Grin2a* и *Grin2b* ионотропных NMDA рецепторов, а также повышает экспрессию генов белков *Mal*, *Mbp* и *Ugt8a*, участвующих в процессах миелинизации.

2. Сочетание стресса в ранний постнатальный период и социального стресса во взрослом возрасте негативно влияет на активность ключевых генов глутаматной системы *Homer1* и *Sorcs3* в префронтальной коре головного мозга у самцов мышей, а также повышает уровень экспрессии генов *Ciart* и *Dbp*, что связано с нарушениями циркадных ритмов.

Апробация результатов. Результаты данной работы были представлены на 10th IBRO World congress in Neuroscience (Тэгу, Корея, 2019), 11 международной конференции «Биоинформатика и структурная геномика» (Новосибирск, Россия, 2018); 4-й конференции «Гиппокамп и память: норма и патология» (Пушино, Россия, 2018); международной конференции «Беляевские чтения» (Новосибирск, Россия, 2017); 24 международной мультидисциплинарной конференции «Стресс и поведение» (Санкт Петербург, Россия, 2017); VII Международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология живых существ» (Звенигород, Россия, 2016).

По материалам работы опубликованы следующие статьи в рецензируемых журналах:

1. **Reshetnikov, V. V.**, Auriyants, K. A., Ryabushkina, Y. A., Sozonov, N. G., & Bondar, N. P. (2021). Sex-specific behavioral and structural alterations caused by early-life stress in C57BL/6 and BTBR mice. *Behavioural Brain Research*, 414, 113489.
2. **Решетников В.В.**, Бондарь Н.П. Роль изменений экспрессии *Homer1* в чувствительности к стрессу. *Биохимия* 2021. – Т. 86. – №. 6. – С. 755-770. Перевод: **Reshetnikov V. V.**, Bondar N. P. The Role of Stress-Induced Changes of *Homer1* Expression in Stress Susceptibility // *Biochemistry (Moscow)*. – 2021. – Т. 86. – №. 6. – С. 613-626.
3. **Reshetnikov, V. V.**, Kisaretova, P. E., Ershov, N. I., Merkulova, T. I., & Bondar, N. P. (2021). Social defeat stress in adult mice causes alterations in gene expression, alternative splicing, and the epigenetic landscape of

- H3K4me3 in the prefrontal cortex: an impact of early-life stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 106, 110068.
4. **Reshetnikov, V.**, Ryabushkina, Y., Kovner, A., Lepeshko, A., & Bondar, N. (2020). Repeated and single maternal separation specifically alter microglial morphology in the prefrontal cortex and neurogenesis in the hippocampus of 15-day-old male mice. *NeuroReport*, 31(18), 1256-1264.
 5. **Reshetnikov, V. V.**, Kisaretova, P. E., Ershov, N. I., Merkulova, T. I., & Bondar, N. P. (2020). Data of correlation analysis between the density of H3K4me3 in promoters of genes and gene expression: Data from RNA-seq and ChIP-seq analyses of the murine prefrontal cortex. *Data in brief*, 33, 106365.
 6. Antontseva, E., Bondar, N., **Reshetnikov, V.**, & Merkulova, T. (2020). The effects of chronic stress on brain myelination in humans and in various rodent models. *Neuroscience*, 441, 226-238.
 7. Bondar, N., Bryzgalov, L., Ershov, N., Gusev, F., **Reshetnikov, V.**, Avgustinovich, D., Tenditnik, M., Rogaev E. & Merkulova, T. (2018). Molecular Adaptations to Social Defeat Stress and Induced Depression in Mice. *Molecular neurobiology*, 55(4), 3394-3407.
 8. Bondar, N. P., Lepeshko, A. A., & **Reshetnikov, V. V.** (2018). Effects of early-life stress on social and anxiety-like behaviors in adult mice: sex-specific effects. *Behavioural neurology*, 1538931
 9. Ershov, N. I., Bondar, N. P., Lepeshko, A. A., **Reshetnikov, V. V.**, Ryabushkina, J. A., & Merkulova, T. I. (2018). Consequences of early life stress on genomic landscape of H3K4me3 in prefrontal cortex of adult mice. *BMC genomics*, 19(3), 93.
 10. **Reshetnikov, V. V.**, Studenikina, A. A., Ryabushkina, J. A., Merkulova, T. I., & Bondar, N. P. (2018). The impact of early-life stress on the expression of HPA-associated genes in the adult murine brain. *Behaviour*, 155(2-3), 181-203.

11. **Reshetnikov, V. V.**, Lepeshko, A. A., Ryabushkina, Y. A., Studenikina, A. A., Merkulova, T. I., & Bondar, N. P. (2018). The long-term effects of early postnatal stress on cognitive abilities and expression of genes of the glutamatergic system in mice. *Neurochemical Journal*, 12(2), 142-151.
12. **Решетников В. В.**, Лепешко, А. А., Рябушкина, Ю. А., Студеникина, А. А., Меркулова, Т. И., & Бондарь, Н. П. Отсроченные эффекты раннего постнатального стресса на когнитивные способности и экспрессию генов глутаматергической системы у мышей // *Нейрохимия*. – 2018. – Т. 35. – №. 2. – С. 140-150.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и заключения. Работа изложена на 185 страницах, содержит 26 рисунков, 6 таблиц и 4 приложения.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность сотрудникам сектора молекулярной нейробиологии стресса и лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦиГ СО РАН и лично научному руководителю к.б.н. Бондарь Н.П. и д.б.н. Меркуловой Т.И. за помощь, оказанную на всех этапах выполнения работы. Кроме того, автор выражает благодарность к.б.н. Н.И. Ершову за биоинформатическую обработку данных; к.б.н. Антонову Е.В. за помощь в хроматографическом анализе уровня кортикостерона; и к.б.н. Хоцкину Н.В. за помощь с настройкой и обработкой поведенческих данных с помощью программы EthoStudio.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Молекулярные механизмы ответа на стресс

Основной эндокринной системой организма, которая обеспечивает гомеостаз, в то время как организм подвергается негативному воздействию или стрессу, является гипоталамо–гипофизарно–надпочечниковая система (ГГНС). В условиях стресса происходит активация ГГНС, включающая в себя высвобождение кортикотропин-рилизинг-фактора (КРФ) из паравентрикулярных ядер гипоталамуса (ПВЯ) в портальный венозный кровоток гипофиза, где КРФ стимулирует синтез проопиомеланкортина, предшественника аденокортикотропного гормона (АКТГ) в клетках передней доли гипофиза. Помимо КРФ в стимуляции секреции АКТГ также принимает участие другой нейропептид – антидиуритический гормон (АДГ), который является мощным синергетическим фактором КРФ (Aguilera and Rabadan-Diehl, 2000; Bhattacharya et al., 1999). АКТГ связывается с меланокортиновыми рецепторами 2-го типа на поверхности клеток коры надпочечников. Это связывание запускает каскад реакций, которые приводят к синтезу кортикостерона или кортизола (в зависимости от вида) из холестерина. Увеличение АКТГ в крови, таким образом, стимулирует высвобождение глюкокортикоидов из коры надпочечников: кортизол является основным глюкокортикоидом у людей, а кортикостерон является основным глюкокортикоидом у таких видов, как крысы или мыши.

Кортизол вырабатывается в пучковой зоне (*zona fasciculata*) коры надпочечников в объеме приблизительно 12–15 мг/м² площади поверхности тела в день (Chrousos, 1995). Тем не менее, у людей и грызунов, более 90% циркулирующего кортизола связано с кортикостероидсвязывающим глобулином (КСГ) (Hammond et al., 1990). Кроме того, было отмечено, что как введение экзогенного глюкокортикоида, так и эндогенное повышение уровня кортизола в плазме (наблюдаемое, например, при синдроме Кушинга)

приводит к снижению концентрации КСГ в плазме на 30–40% (Frairia et al., 1988). Таким образом, уровни КСГ колеблются в зависимости от концентрации глюкокортикоидов.

Выработка АКТГ подчинена так называемым ультрадианным ритмам (порционное высвобождение в зависимости от времени суток). У людей всплески наиболее часты ранним утром и гораздо реже наблюдаются в вечернее время (Ganong, 1991). Считается, что биологические часы, ответственные за суточный ритм АКТГ, расположены в супрахиазматических ядрах гипоталамуса. Изменения в активности этих нейронов увеличивают высвобождение КРФ и антидиуритического гормона (АДГ) в ПВЯ гипоталамуса во время пиковой активности (Meijer and Rietveld, 1989). Следовательно, полагают, что секреция КРФ и АДГ также изменяется в зависимости от стадии ультрадианного ритма. Однако уровни КРФ в периферической плазме человека очень низки и не показывают циркадных изменений (Ur and Grossman, 1992), и, следовательно, концентрацию КРФ в плазме крови нельзя использовать для оценки выброса КРФ в гипоталамусе. Таким образом, ритмичность активности ГГНС, подверженная ультрадианным ритмам, является важной особенностью работы системы (Young and Altemus, 2004).

Кортизол опосредует свое действие через два различных подтипа внутриклеточных рецепторов кортикостероидов - минералокортикоидные рецепторы (МР) и глюкокортикоидные рецепторы (ГР) (De Kloet et al., 1998; McEwen, 2000). Взаимодействие глюкокортикоидов с рецепторами запускает многоступенчатый процесс активации и транслокации рецепторов в ядро, где ГР или МР действуют в качестве транскрипционных активаторов или репрессоров, связываясь с так называемыми глюкокортикоид-чувствительными последовательностями (glucocorticoid responsive elements). В частности, связывание ГР в ядре с глюкокортикоид-чувствительными последовательностями в гипоталамусе и гипофизе приводит к

ингибированию экспрессии КРФ и проопиомеланкортина, что, в конечном счете, приводит к снижению активности ГГНС и завершению стрессорного ответа. Такая регуляция стрессорного ответа получила название механизма отрицательной обратной связи. Таким образом, глюкокортикоиды контролируют свой собственный синтез и высвобождение посредством петли отрицательной обратной связи на уровне передней доли гипофиза (Rose and Nelson, 1956), гипоталамуса (Schapiro et al., 1958) и других высших центров, включая ретикулярную формацию (Corbin et al., 1965).

Минералокортикоидные рецепторы имеют высокую плотность преимущественно в лимбических структурах мозга (Reul et al., 1987). Распространенность ГР в мозге более обширное, этот рецептор экспрессируется практически во всех структурах мозга (Fuxe et al., 1985). Стоит отметить, что важную роль в подавлении стрессорного ответа играет экспрессия этих рецепторов в гиппокампе. Как известно, гиппокамп является важным модулятором активности ГГНС (De Kloet et al., 1998). В отсутствие стресса и негативных воздействий, при физиологических уровнях кортикостероидов, отрицательная обратная связь в гиппокампе опосредуется в основном через МР, тогда как при стрессе и высоких концентрациях кортикостероидов обратная связь опосредуется посредством менее чувствительных к глюкокортикоидам ГР (De Kloet et al., 1998). Баланс между МР и ГР рецепторами, по всей видимости, имеет решающее значение в модуляции активности ГГНС (De Kloet et al., 1998). Помимо ГР и МР активность ГГНС регулируется некоторыми другими факторами, среди которых важную роль играют иммунофилин FKBP5 (FK506 binding protein 5) и иммунофилин FKBP4 (FK506 binding protein). Эти белки являются кошаперонами ГР и МР, контролируют транслокацию этих рецепторов в ядро (Galigniana et al., 2010; Merkulov et al., 2017). Дисбаланс FKBP5 и FKBP4, также как и самих рецепторов ГР и МР может приводить к различным нарушениям. В частности, избыточная экспрессия FKBP5, а

также сниженная экспрессия FKBP4 приводят к затруднению транслокации рецепторов в ядро и, в конечном итоге, к нарушению гормональной трансдукции сигнала (Guidotti et al., 2013).

1.2. Особенности постнатального периода развития

Постнатальный период является важным периодом в онтогенезе каждого индивида. В этот период завершается формирование многих структур мозга. У человека до 2-х летнего возраста продолжается интенсивное развитие гиппокампа, завершение развития префронтальной коры происходит в возрасте от 8 до 14 лет, в то же время миндалины продолжают формироваться до 20-ти летнего возраста (Giedd et al., 1996). Следует отметить, что у разных видов степень сформированности различных регионов мозга к моменту рождения различная. У человека, приматов, овец и морских свинок большая часть нейроэндокринного созревания структур мозга происходит в утробе матери. Однако крысы, кролики и мыши рожают менее зрелых с точки зрения нейроэндокринного созревания мозговых структур детенышей, и большая часть этого развития происходит во время постнатального периода (Karoo et al., 2008). Таким образом, пренатальный и постнатальный стресс могут оказывать различные эффекты у разных видов, поскольку перинатальные манипуляции могут влиять на разные стадии развития мозга в зависимости от вида. По этой причине, стресс в первую неделю жизни у грызунов часто приравнивается к стрессу в течение последнего триместра беременности у человека относительно стадии развития мозга. У грызунов и человека этот период является особенным для функционирования ГНС. У грызунов пик продукции глюкокортикоидов приходится на последний период гестации (третья неделя беременности) (Dalle et al., 1978; Dupouy et al., 1975) и считается критическим для развития плода. На второй постнатальный день (ПД2) уровень глюкокортикоидов падает до минимального уровня и остается на низком уровне до конца второй недели постнатальной жизни. У людей наблюдается схожая ситуация, так в

момент рождения и сразу после него уровень глюкокортикоидов резко возрастает в ответ на различные стрессоры. Тем не менее, в течение первого года жизни ГГНС становится менее чувствительна к стрессовым воздействиям. В этот период наблюдается сниженный ответ ГГНС на внешние раздражители. На молекулярном уровне это сопровождается сниженным базовым уровнем экспрессии КРФ и, следовательно, низким уровнем глюкокортикоидных гормонов в крови. Этот период называется гипочувствительным к стрессу (*stress hyporesponsive period*) (Sapolsky and Meaney, 1986b; Schmidt et al., 2003). У человека гипочувствительный период продолжается, вероятно, вплоть до подросткового возраста, однако точных данных нет. У грызунов этот период длится первые две недели жизни (Sapolsky and Meaney, 1986b; Schapiro, 1962). Такой период в онтогенезе, по всей видимости, является адаптационным, поскольку он обеспечивает стабильно низкий уровень глюкокортикоидов, который является оптимальным для формирования синапсов нейронов, трансформации микроглии из амебоидной в разветвлённую и миелинизации аксонов в головном мозге. Хроническое повышение уровня глюкокортикоидов в крови во время периода низкой восприимчивости к стрессу может быть вызвано, например, хроническим стрессом, таким как длительное отделение детенышей от матерей (Eldridge et al., 1989; Mitchell et al., 1990; Sapolsky, 1985). Длительное отделение от матери в ранний период жизни может повлиять на чувствительные к глюкокортикоидам области мозга, такие, например, как гиппокамп, который имеет высокую плотность МР и ГР (Eldridge et al., 1989; Mitchell et al., 1990; Sapolsky, 1985). Хроническое увеличение концентрации глюкокортикоидов, в конечном счете, может привести к гибели нейронов в гиппокампе, изменениям в плотности распределения ГР и привести к нарушению эффективности отрицательной обратной связи ГГНС во взрослом возрасте (Sapolsky, 1985).

Известно, что крысы в неонатальный период (первая неделя жизни), как правило, нечувствительны к мягким стрессорам (например, инъекциям физиологического раствора) (Levine et al., 1991). В то же самое время, длительное отделение детенышей от матери в течение 24 часов во время гипочувствительного периода приводит к значительному повышению АКТГ (Daskalakis et al., 2011) и кортикостерона, которые остаются на повышенном уровне продолжительный период времени после воздействия стрессора (Goldman et al., 1973). Вероятно, материнская забота оказывает тормозящее влияние на развитие ответа на стресс в раннем возрасте (Orso et al., 2018). Известно, что некоторые показатели материнской заботы у грызунов, такие как вылизывание, груминг (чистка) или аркообразная поза при кормлении, оказывают влияние на усиление синаптогенеза и когнитивных способностей потомков (Liu et al., 2000b). Наоборот, снижение материнской заботы может привести к развитию ангедонии в подростковом периоде (Molet et al., 2016). Таким образом, механизмы, необходимые для запуска соответствующего эндокринного ответа после стресса, присутствуют на ранней стадии развития, но различные компоненты материнской заботы (кормление и поглаживание), по-видимому, способны ингибировать или ослаблять данную реакцию (Orso et al., 2018; Suchecki et al., 1993).

1.3. Ранний постнатальный стресс у людей

У людей неблагоприятные события в раннем возрасте увеличивают риск возникновения различных поведенческих нарушений, которые развиваются в более позднем возрасте. К таким нарушениям относятся, в частности, нарушения когнитивных способностей, повышенная чувствительность к стрессу, а также широкий спектр психических патологий, таких как расстройства настроения, повышенный уровень тревожности и шизофрения (Heim et al., 2012; Nakamata et al., 2022). Неблагоприятные события могут быть разной природы и силы – потеря родителей, физическое и эмоциональное насилие или даже низкий социально-экономический статус

(Dube et al., 2001; Kessler et al., 2010). Бернштейн с коллегами (Bernstein et al., 2003), предложил разделение жестокого обращения с детьми на следующие категории:

1. Физическое насилие: физическая агрессия со стороны кого-то старше, с риском травмы.

2. Эмоциональное насилие: словесная агрессия, которая влияет на благополучие или моральное состояние ребенка или любое поведение, которое унижает, смущает или угрожает ребенку.

3. Сексуальное насилие: любой тип сексуального контакта или поведения между ребенком и кем-то старше.

4. Эмоциональное пренебрежение: неспособность опекунов удовлетворить основные эмоциональные и психологические потребности, такие как любовь, мотивация и поддержка.

5. Физическое пренебрежение: неспособность опекунов обеспечить основные физические потребности, такие как питание, дом, безопасность, забота о здоровье.

Жестокое обращение с детьми является серьезной социальной проблемой. Это сложное глобальное явление, которое находится вне классов, рас, религий, возраста или уровня образования и может происходить как публично, так и в частном порядке, и, в конечном счете, может привести к серьезным физическим травмам или даже смерти. Более того, такое обращение с детьми может сильно повлиять на их психическое здоровье в зрелом возрасте (Carr et al., 2013).

Многочисленные данные из различных исследований свидетельствуют о преимущественной роли ранних неблагоприятных событий в развитии расстройств настроения и тревожности (Kessler et al., 2010). Жестокое обращение с детьми и отсутствие заботы о них могут быть факторами, вызывающими нарушение развития нервной системы и, в зависимости от того, когда они действуют, могут вызывать серьезные неврологические

нарушения в некоторых структурах мозга. Такие нарушения в развитии могут сделать некоторых людей уязвимыми для определенных типов психопатологии, особенно депрессии, посттравматического стрессового расстройства и токсикомании (Baes et al., 2012; Heim et al., 2008; Nemeroff et al., 2003). Недавний мета-анализ показал, что стресс в ранний период жизни увеличивает риск развития депрессии у подростков более чем в 2 раза (LeMoult et al., 2020).

В настоящее время накопилось множество данных о том, что стресс в раннем детстве может вызывать нарушение регуляции ГГНС при дополнительном стрессе во взрослом возрасте. Это нарушение может привести к повышенной восприимчивости к депрессии. На молекулярном уровне эти нарушения регуляции ГГНС, по-видимому, связаны с нарушением способности регулировать отрицательную обратную связь (Baes et al., 2012; Heim et al., 2008; Nemeroff et al., 2003). Однако, исследования эффектов жестокого обращением в детстве и дисрегуляции ГГНС у детей дали противоречивые результаты. Так, у пациентов с депрессией, которые в детстве подвергались жесткому обращению, чаще наблюдается гиперактивность ГГНС, устойчивость к стандартным антидепрессантам, но в тоже время они были более восприимчивы к лечению психотерапией (Baes et al., 2012; Heim et al., 2008; Nemeroff et al., 2003). Таким образом, можно сделать вывод о том, что жестокое обращение с детьми может привести к сбоям в работе ГГНС, однако многое зависит от степени выраженности жестокого обращения, его продолжительности и возраста начала действия стресса.

1.4. Модели раннего постнатального стресса на животных

Одной из первых экспериментальных моделей раннего постнатального стресса, описанных у грызунов, является модель кратковременного отделения (КО) детенышей от матерей, разработанная Сеймуром Левином в 1957 году (Levine, 1957). Главной характеристикой этой модели является

ежедневная физическая манипуляция с пометом, когда детеныши отделяются от матери на короткий промежуток времени (до 15 минут). Было показано, что эта процедура, которая проводится в течение первых 2-3 недель жизни, стимулирует проявление активных форм заботы матерями после возвращения детенышей в гнездо (Liu et al., 1997), в тоже самое время у детенышей наблюдается стрессорный ответ (Meaney et al., 1991). В то время как КО стимулирует усиление материнской заботы, длительное отделение детенышей (ДО) от матерей приводит к снижению уровня материнской заботы, получаемой детенышами, тем самым моделируя эмоциональное и физическое пренебрежение. Следует отметить, что методология в моделях ДО сильно варьирует, в частности, различается продолжительность отделения (от 2 до 8 часов ежедневно), соблюдение температурного режима (с поддержанием температуры гнезда и без) и тип изоляции детенышей (индивидуальная изоляция или отделение всего помета в целом) (Tractenberg et al., 2016a).

Работы на крысах показали, что кратковременное отделение детенышей от матерей в ранний период жизни приводит зачастую к положительным изменениям во взрослом возрасте, в частности, к снижению тревожности, усилению исследовательской активности и коммуникативности, а также к улучшению пространственной памяти и способности к обучению, в то время как продолжительное отделение детенышей от матери ведет к противоположным эффектам (Aisa et al., 2007; Fenoglio et al., 2005; Lippmann et al., 2007a; Pryce and Feldon, 2003). У мышей данные о влиянии длительного и кратковременного отделения от матерей на поведенческих фенотип, память и обучение противоречивы (Mehta and Schmauss, 2011; Millstein and Holmes, 2007; Savignac et al., 2011; Veenema et al., 2007). Так, одни исследователи отмечают, что только у некоторых чувствительных линий мышей длительное отделение детенышей приводит к когнитивным нарушениям (Mehta and Schmauss, 2011; Wang et al., 2011), в то

же время в других работах не находят каких либо влияний на память и обучение вне зависимости от линии и используемой модели (Kember et al., 2012b; Savignac et al., 2011).

Еще одной моделью раннего постнатального стресса является однократное длительное отделение детенышей от матерей (ОДО), в течение суток (20-24 часа) в первые две недели жизни. ОДО вызывает ряд отсроченных во времени поведенческих изменений (Marco et al., 2015). В частности, в подростковом возрасте самцы крыс, подвергнутые ОДО, демонстрируют черты депрессивно-подобного поведения в тесте вынужденного плавания (Llorente et al., 2007), а также усиление двигательной активности в ответ на новый стимул (Marco et al., 2007). Во взрослом возрасте самцы крыс также демонстрируют черты депрессивно-подобного поведения, помимо этого у них наблюдается усиление агрессивности (Zamberletti et al., 2012), гиперактивное поведение и пониженный уровень тревожности (Burke et al., 2013).

ОДО не следует рассматривать исключительно как модель стресса, связанную с отделением детенышей от матерей, эта модель обеспечивает сочетание стрессов различной этиологии. Во-первых, отсутствие материнской заботы в течение 24 часов, по-видимому, играет ключевую роль, хотя уровень материнской заботы усиливается сразу после воссоединения детенышей с матерью, что обеспечивает частичную компенсацию эффектов стресса (Llorente-Berzal et al., 2011; Macri et al., 2008). Недостаток питательных веществ в течение всего периода разделения также играет важную роль. Действительно, в этот период у детенышей наблюдается резкое снижение уровня лептина, основным источником которого в этом возрасте является материнское молоко, кроме того, у детенышей также развивается гипогликемия (Viveros et al., 2010). Аналогично с ДО моделью, процесс отделения детенышей от матерей приводит к стрессированию самки, что, в свою очередь, может повлиять не только на материнское поведение, но

и на выработку молока (Ellenbroek and Cools, 2002). Наконец, в некоторых протоколах ОДО не поддерживается привычная для детенышей температура, что приводит к снижению температуры тела – гипотермии. Гипотермия у детенышей из-за отсутствия зрелой системы терморегуляции также может внести свой вклад в развитие стрессорного ответа.

В последнее время начала интенсивно изучаться еще одна модель стресса в ранний период жизни – модель связанная с ограниченными условиями материала гнездования (ОМГ). Как следует из названия, в отличие от предыдущих моделей эта модель не связана с физическим отделением детенышей от матерей. Однако искусственное создание обедненных условий среды также направлено на создание стрессорной ситуации, что, в конечном счете, может привести к нарушению взаимодействия матери с детенышами. Показано, что ОМГ приводит к фрагментации поведения матери по отношению к ее детенышам и нарушению когнитивных способностей детенышей во взрослом возрасте (Rice et al., 2008). Исследования на грызунах (для обзора см. (Walker et al., 2017)) показали, что помимо нарушения когнитивных функций ОМГ в ранний период жизни приводит к повышенной тревожности и ангедонии во взрослом возрасте, а также изменению метаболизма жировой ткани. Взрослые потомки, подвергнутые ОМГ, более чувствительны к стрессовым событиям.

Еще одной моделью стресса в неонатальный период является модель неонатального индуцированного воспаления. Не смотря на то, что эта модель не связана напрямую со стрессированием, в ряде исследований показано, что индуцированное воспаление приводит и к нарушению функционирования ГГНС (Khantakova et al., 2022). Новорожденные очень чувствительны к различным видам инфекций, в связи с продолжением созревания/формирования различных органов и систем организма, включая иммунную систему (Yu et al., 2018). Особенностью иммунной системы новорожденных является, то что их адаптивный иммунитет только

формируется. Поэтому реакции врожденного иммунного ответа имеют решающее значение для выживания в ранний неонатальный период (Yu et al., 2018). Известно, что некоторые молекулы (цитокины, молекулы адгезии, система комплимента), участвующие во врожденном иммунитете, экспрессируются в здоровом мозге, и играют важную роль в нейрогенезе, миграции, дифференцировке, образовании синапсов и пластичности (Irwin and Cole, 2011). Таким образом, как недостаток, так и чрезмерная активация иммунной системы в раннем возрасте может иметь потенциально пагубные долгосрочные последствия для развития мозга.

Классической моделью неонатального индуцированного воспаления является использование миметиков, таких как липополисахарид (бактериальный эндотоксин) или полиинозиновая: полицитидиловая кислота (PolyI:C, синтетический аналог двухцепочечной РНК вирусов). Использование миметика, а не живой бактерии, имеет ряд преимуществ: биобезопасность, дозозависимая интенсивность иммунного ответа (Furube et al., 2018). Стоит отметить, что миметики не в состоянии моделировать полный спектр иммунных реакций, вызываемых бактериальной инфекцией, а только имитируют связанные с цитокинами реакции острой фазы воспаления (Schwarz and Bilbo, 2011). Однократное или двухкратное введение липополисахарида или PolyI:C в неонатальный период вызывает сильный стресс, который может быть опосредован как вызванной иммунной активацией, так и перепрограммированием иммунной функции взрослого организма, т.е. изменением того, как происходит реакция на последующую иммунную провокацию во взрослом возрасте (Bilbo and Schwarz, 2012). Исследования на грызунах и людях подтверждают, что воспалительные процессы во время неонатального периода могут привести к развитию нейropsychических расстройств в будущем (Cao et al., 2021; Chaplin et al., 2020; Khandaker et al., 2014; Liang et al., 2019).

1.5. Структурные и функциональные изменения в головном мозге под действием раннего постнатального стресса

Исследования на человеке демонстрируют, что у взрослых индивидуумов, подвергнутых насилию или жестокому обращению в детстве, наблюдалось уменьшение объема миндалевидного тела, медиальной префронтальной коры, гиппокампа (McLaughlin et al., 2019). Дети, которые испытывали пренебрежения со стороны родителей или опекунов демонстрировали уменьшение объема лобно-теменных областей мозга (McLaughlin et al., 2019). Миндалевидное тело выполняет центральную роль в процессах аверсивного обучения, обнаружении угроз и мобилизации защитных реакций во время стресса (LeDoux, 2012). Помимо этого, активация миндалевидного тела играет важную роль в мотивационном поведении (Costafreda et al., 2008; Fusar-Poli et al., 2009). Гиппокамп играет важную роль в регуляции ГГНС, обеспечивая завершение стрессорного ответа (Jacobson and Sapolsky, 1991). Как гиппокамп, так и миндалевидное тело связаны с различными регионами префронтальной коры. Взаимосвязь дорзального гиппокампа с префронтальной корой важна для формирования и извлечения памяти и связана с когнитивными способностями (Euston et al., 2012). Взаимосвязь миндалевидного тела с различными областями префронтальной коры играет важную роль в регуляции эмоций и мотивации (Dixon et al., 2017; Roy et al., 2009). Вентральный отдел гиппокампа анатомически и функционально связан с миндалевидным телом и играет важную роль в запоминании контекст-зависимой эмоциональной памяти, механизмах тревоги и страха (McHugh et al., 2004). Функциональный анализ изменений в головном мозге, проведенный с помощью функциональной-магнитно-резонансной томографии (functional magnetic resonance imaging, fMRI) показал, что жестокое обращение в детстве усиливает реактивность миндалевидного тела в ответ на негативные стимулы (van Harmelen et al., 2013); было установлено, что такие эмоции как страх и гнев приводили к большей активации миндалин и усилению симптомов тревожности у людей,

подвергнутых стрессу в ранний период жизни (Fonzo et al., 2016). Помимо этого у стрессированных в детстве индивидуумов наблюдалось нарушение способности фронтальной коры подавлять активность миндалевидного тела во время негативных эмоций (Kim et al., 2013).

Стресс в детском возрасте оказывает также влияние на процессы миелинизации в головном мозге (Antontseva et al., 2020). С помощью методов нейровизуализации было выявлено снижение фракционной анизотропии в ассоциативном тракте (*uncinate fasciculus*) у молодых людей, перенесших стресс в детстве, что свидетельствует о снижении уровня миелинизации. Эти изменения коррелирует с симптомами депрессии и тревоги, а также с повышенной восприимчивостью к последующему стрессу (Hanson et al., 2015). Кроме того, мета-анализ показал, что фракционная анизотропия в мозолистом теле снижалась только у взрослых пациентов с посттравматическим стрессовым расстройством, которые также имели в анамнезе травматические события в детстве (Siehl et al., 2018).

Чтобы определить возможные механизмы, с помощью которых стресс в раннем возрасте приводит к нарушению процессов миелинизации у пациентов с депрессией, был проведен сравнительный анализ посмертных образцов передней части поясной извилины от пациентов с депрессией, которые умерли в результате самоубийства, как с историей стресса в детстве в анамнезе, так и без него (Lutz et al., 2017). Авторы выявили существенные нарушения целостности аксонов и миелинизации отдельных волокон (преимущественно аксонов малого диаметра) у взрослых с опытом жестокого обращения в детстве.

Таким образом, в исследованиях на людях получены убедительные доказательства того, что стресс в ранний период жизни приводит к структурным и функциональным изменениям в ключевых областях мозга, таких как префронтальная кора, гиппокамп и миндалевидное тело.

Исследования на животных могут улучшить наше понимание молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе отставленных эффектов стресса в ранний период жизни, и установить причинно-следственную связь между неблагоприятными событиями в раннем возрасте и когнитивными и эмоциональными нарушениями в более позднем возрасте (Chen and Varam, 2016). У крыс длительное отделение детенышей от матерей приводит к атрофии дендритных шипиков, а также снижению синаптической плотности в пирамидальных нейронах 2-3 слоя префронтальной коры (Chocuyk et al., 2013). Помимо этого, в других работах установлено, что длительное отделение от матерей в раннем возрасте уменьшает пролиферацию клеток в ростральном миграционном тракте (Rostral Migratory Stream) (на ПД 14, ПД 21 и ПД 28), выживаемость, дифференцировку и плотность клеток в зубчатой извилине гиппокампа на ПД 15 (Lajud et al., 2012; Rasekova et al., 2009). Эти структурные изменения в гиппокампе сохраняются вплоть до взрослого возраста. Так, у взрослых самцов крыс с историей ДО в ранний период жизни было найдено сниженное число созревающих нейронов в зубчатой извилине гиппокампа (Aisa et al., 2009; Mirescu et al., 2004). Длительное отделение от матерей более выражено влияет на нейрональную пластичность в гиппокампе, чем кратковременное отделение. В некоторых работах (Huot et al., 2002; Orelan et al., 2010) было показано, что ДО приводит к уменьшению количества гранулярных клеток в DG и снижает плотность мшистых волокон (mossy fiber) у ювенильных и взрослых крыс по сравнению с КО группой. Кроме того, в исследовании нашей группы было показано, что длительное отделение от матерей в детстве приводит к снижению количества зрелых нейронов в СА3 зоне гиппокампа у взрослых самок (Reshetnikov et al., 2020b).

На модели с разным уровнем материнской заботы установлено, что потомки матерей с низким уровнем материнской заботы имеют менее разветвленные нейроны в зоне СА1 гиппокампа и зубчатой извилины,

сниженную дендритную плотность и снижение экспрессии синаптических белков в этих областях гиппокампа по сравнению с потомками матерей с высоким уровнем материнской заботы (Bagot et al., 2009; Champagne et al., 2008; Liu et al., 2000a). Помимо этого, у потомков матерей с низким уровнем материнской заботы наблюдается снижение нейрогенеза в зубчатой извилине (Bredy et al., 2003). Влияние уровня материнской заботы, полученной в детстве, на показатели нейрональной пластичности демонстрирует работа Ван Хассельта, где установлено, что уровень материнской заботы, получаемый каждым отдельным детенышем внутри одного помета положительно коррелирует с плотностью дендритных шипиков в дорсальном гиппокампе (van Hasselt et al., 2012). Тем не менее, в вентральном гиппокампе, который связан с эмоциональным поведением, возбудимость, синаптическая потенция у животных с низким уровнем материнской заботы повышена по сравнению с животными с высоким уровнем материнской заботы (Nguyen et al., 2015), что, вероятно, связано с тем, что эти животные имеют повышенную эмоциональную реактивность.

Ранний постнатальный стресс также приводит к нарушению миелинизации у грызунов. В исследовании на новорожденных крысах Sprague-Dawley (Yang et al., 2017a), которых отделяли от матерей на 3 часа в день с 3-го по 21-й день после рождения было показано снижение толщины миелиновой оболочки в коре. Более того, у этих животных наблюдаось увеличение количества клеток предшественников олигодендроцитов (NG2+) в медиальной префронтальной коре, тогда как количество зрелых олигодендроцитов (Olig2+, CC1+) было значительно снижено. Следовательно, ранний постнатальный стресс может нарушать дифференцировку клеток предшественников олигодендроцитов и влияет на образование зрелых олигодендроцитов; это явление может быть причиной гипомиелинизации у стрессированных крыс.

1.6. Возможные молекулярные механизмы эффектов раннего постнатального стресса

Как известно стресс приводит к изменению активности множества нейроэндокринных систем. На молекулярном уровне эти события сопровождаются нарушением/изменением скорости экспрессии генов (транскрипционный уровень регуляции), биосинтеза белка (трансляционный уровень), фолдинга и посттрансляционных модификаций белковых молекул (посттрансляционный уровень регуляции). Поскольку ранний постнатальный стресс приводит к устойчивым во времени эффектам, которые сохраняются и у взрослых индивидов, предполагают, что эти отставленные во времени эффекты могут быть «закреплены» на молекулярном уровне с помощью эпигенетических механизмов (Burns et al., 2018). Основные эпигенетические модификации, влияющие на уровень экспрессии генов представлены на Рис.1.

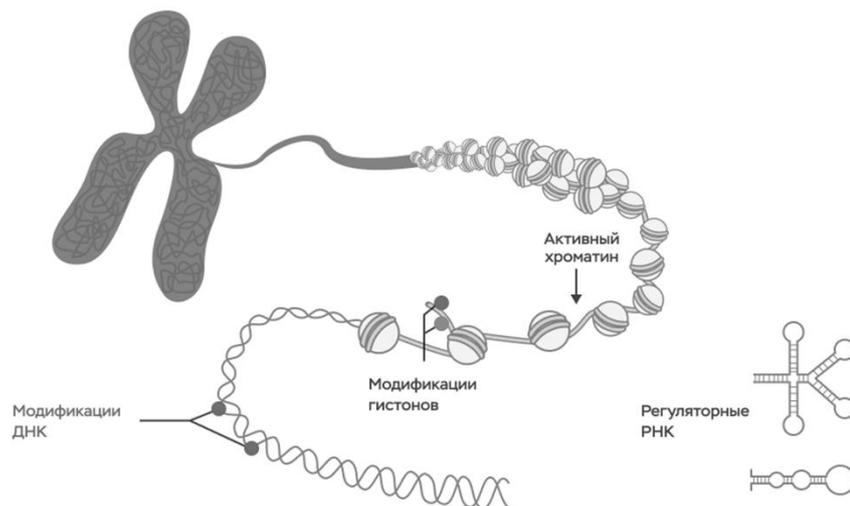


Рисунок 1. Схематическое представление основных эпигенетических модификаций, влияющих на уровень экспрессии генов

1.6.1. Метилирование ДНК

Перенос метильной группы от S-аденозил-метионина на остаток цитозина по 5-му положению, находящегося в специфической последовательности в двухцепочечной ДНК, с образованием 5-метилцитозина (5mC) является основной эпигенетической модификацией

ДНК. Метилирование цитозина по 5' положению, наиболее вероятно происходит в цитозин-богатых участках ДНК, длиной от 100 до 2000 п.н., так называемых «СрG (цитозин-фосфат-гуаниновых) островках».

Исследования как на человеке, так и на животных показывают, что ранний постнатальный стресс может приводить к устойчивому изменению уровня метилирования отдельных генов (Laubach et al., 2021; McGowan et al., 2009; Murgatroyd et al., 2009; Provencal et al., 2012; Stenz et al., 2018; Wu et al., 2014; Xu et al., 2020), причем некоторые из этих изменений способны передаваться в ряду поколений, однако молекулярный механизм такой передачи не до конца ясен (Stenz et al., 2018). В качестве наиболее вероятного механизма эпигенетической передачи эффектов стресса в ряду поколений исследователи рассматривают передачу через различные регуляторные РНК в сперме (Dickson et al., 2018; Zheng et al., 2021).

1.6.2. Модификации гистонов

Модификации гистонов – одни из наиболее распространенных эпигенетических модификаций генома. Четыре пары коровых гистонов (H3, H4, H2A, H2B) образуют октамер, вокруг которого намотано 147 п. н. ДНК, весь этот комплекс является нуклеосомой, фундаментальной единицей хроматина. Молекулы гистона H1 связываются с линкерной ДНК за пределами коровых частиц, что обеспечивает образование компактных нуклеосомных фибрилл при компактизации ДНК. Коровые гистоны преимущественно глобулярные, за исключением их N-терминальных концов, которые не являются структурированными. Характерной чертой гистоновых белков является большое число модификаций остатков на N-конце. На данный момент хорошо изучены ковалентные модификации гистонов H3 и H4 (ацетилирование, метилирование и фосфорилирование) (Kouzarides, 2007). В целом, эпигенетические модификации гистонов локализованы на N-терминальных окончаниях и действуют в двух направлениях: они могут изменять электростатический заряд и, следовательно, уровень конденсации

хроматина, либо привлекать специфические гистон-связывающие белки, которые изменяют процесс транскрипции. Ацетилирование имеет наибольший потенциал к разрыхлению хроматина, поскольку эта модификация нейтрализует исходный заряд лизина. Метилирование гистонов может индуцировать или подавлять экспрессию генов, зависящую от того, какой остаток метилирован и в какой степени (Khare et al., 2012). Фосфорилирование гистонов также может приводить к активации или подавлению экспрессии генов (Stankiewicz et al., 2013). Также существуют другие, менее изученные гистоновые модификации, такие как убиквитинилирование, АДФ рибозилирование. Следует отметить, что некоторые модификации гистонов могут оказывать разнонаправленный эффект на транскрипцию в зависимости от того в какой части гена она расположена. В качестве примера можно привести метилирование гистона H3 по 36 лизину (H3K36). Показано, что эта модификация оказывает положительный эффект на транскрипцию, когда оно находится в кодирующем регионе, и негативный эффект, когда находится в промоторе (Vakoc et al., 2005).

Ранний постнатальный стресс влияет на паттерн распределения гистонов (Torres-Berrio et al., 2019). Это изменения могут быть связаны с изменением активности специфических ферментов, вовлеченных в создание и удаление данных модификаций. Ацетилирование гистонов контролируется ацетилтрансферазами и деацетилазами, метилирование - гистоновыми метилтрансферазами и деметилазами (Wang et al., 2009). В нескольких работах показано, что ранний постнатальный стресс способен влиять на экспрессию этих ферментов в различных регионах мозга (Authement et al., 2015; Levine et al., 2012; Shepard et al., 2018; Yang et al., 2017b).

1.6.3. Некодирующие РНК

Некодирующие РНК выполняют широкий спектр функций. Это гетерогенный класс молекул, которые включают в себя семейства длинных

некодирующих РНК (long non-coding RNAs, lncRNAs), некодирующие РНК умеренной длины РНК (medium non-coding RNAs, mncRNAs) и малые некодирующие РНК (small non-coding RNAs, sncRNAs) (St Laurent et al., 2015). Каждое семейство в свою очередь включает различные типы молекул, всего таких типов выделяют 28. Наиболее изученными в настоящее время считаются микро РНК (miRNA), относящиеся к семейству sncRNAs. miRNAs являются короткими одноцепочечными молекулами РНК, длиной примерно 22-23 нуклеотида. Их основная роль заключается в посттрансляционной репрессии мРНК, посредством связывания с ней и последующей деградации РНК дуплекса (Bartel, 2009). Помимо этой функции работы последних лет также показывают важную роль этих молекул в регуляции различных классов других регуляторных молекул РНК (Ala, 2020; Salmena et al., 2011). Эти исследования предполагают, что помимо классической функции регуляции трансляции, miRNAs способны устанавливать динамический баланс между различными продуктами транскрипции. Данные исследований на грызунах и человеке демонстрируют выраженные эффекты раннего постнатального стресса на отдельные микро РНК в различных регионах мозга и сперме (Dickson et al., 2018; McKibben and Dwivedi, 2021a, b)

1.7. Молекулярные изменения, вызванные ранним постнатальным стрессом

Ранний постнатальный стресс оказывает системный эффект на интенсивно развивающийся мозг индивидуума. В частности, был показан эффект раннего постнатального стресса на активность генов глутаматергической (Roceri et al., 2004; Roceri et al., 2002a), серотонинэргической (Gartside et al., 2003; Matsuzaki et al., 2009), гамма-аминомасляной (Caldji et al., 2000) и глюкокортикоидной (Navailles et al., 2010b; Vazquez et al., 2006) систем. Для некоторых из этих генов были также показаны изменения эпигенетического ландшафта в их регуляторных районах (Li et al., 2020; Torres-Berrio et al., 2019). Следует отметить, что большинство исследований, изучающих эффекты раннего постнатального

стресса на распределение эпигенетических модификаций и экспрессию генов, сфокусированы на оценке регуляторных регионов отдельных генов в различных регионах мозга (Li et al., 2020; Torres-Berrio et al., 2019). В тоже время количество работ, оценивающих эффекты раннего постнатального стресса на эпигенетику и экспрессию генов в рамках всего генома ограничено (Li et al., 2020; Pena et al., 2019a; Torres-Berrio et al., 2019). В данной главе будут описаны основные изменения в экспрессии и распределении эпигенетических модификаций в генах, связанных с ГГНС, процессами миелинизации, нейротрофическими факторами мозга и генами нейротрансмиттерных систем. Эти системы были выбраны потому, что как в исследованиях на людях, так и на животных собрано достаточное количество доказательств изменения экспрессии генов этих систем под влиянием различных видов раннего постнатального стресса.

1.7.1. Молекулярные изменения в генах, связанных с ГГНС

Основной системой, которая наиболее сильно подвержена влиянию раннего постнатального стресса, является ГГНС. Ранний постнатальный стресс оказывает влияние на экспрессию генов, связанных с ответом на стресс, в коре надпочечников, гипофизе, гипоталамусе, а также в гиппокампе, миндалине и различных регионах коры головного мозга. Длительное отделение от матерей приводило к повышению уровня экспрессии генов *Mcr2* (рецептора АКТГ) и *Cyp11b1* (фермента метаболизма кортикостерона - 11β -гидроксилазы) в надпочечниках взрослых самцов мышей (van der Doelen et al., 2014b). В другом исследовании на C57BL/6 мышцах (Wu et al., 2014) было показано, что длительное отделение от матерей в первые две недели жизни приводит к повышению уровня экспрессии гена *Pomc*, который кодирует проопиомеланокортин - предшественник АКТГ, в гипофизе и устойчивому во времени гипометилированию его промотора. Однако большинство исследователей не находили повышения концентрации

АКТГ в плазме крови взрослых животных после раннего постнатального стресса (van Bodegom et al., 2017; van der Doelen et al., 2014b).

В гипоталамусе наиболее выраженное влияние различных видов раннего постнатального стресса наблюдается на экспрессию мРНК гена *Aur*, кодирующей АДГ. Длительное отделение от матерей в первые две недели жизни приводит к усилению экспрессии мРНК *Aur* на 6 и 12 постнатальный день (Dent et al., 2000), которые сохраняются на ПД 14 (Vazquez et al., 2003), ПД21 (Zhang et al., 2012), ПД35 (Veenema and Neumann, 2009) и у взрослых особей (Reshetnikov, 2018; Veenema et al., 2006; Veenema et al., 2007). В одном из первых исследований о влиянии раннего постнатального стресса на эпигенетические изменения Криса Миргатройда (Chris Murgatroyd) (Murgatroyd et al., 2009) в 2009 году было показано, что длительное отделение от матерей в первые 10 дней жизни у мышей приводят к гипометилированию ДНК энхансерных районов гена *Aur* в ПВЯ гипоталамуса. Степень метилирования CpG островков регуляторного района *Aur* имела обратную корреляцию с экспрессией *Aur* в этой структуре мозга. Интересно, что эти изменения были устойчивы во времени, и даже у старых мышей в возрасте 12 месяцев они все еще детектировались, однако степень выраженности этих изменений была меньше, чем у мышей в возрасте 6 недель или 3 месяца.

Исследование по изменениям экспрессии и эпигенетических модификаций генов *Pomc* и *Aur* демонстрируют синхронизацию эпигенетических изменений с изменением экспрессии генов в различных звеньях ГГНС, поскольку АДГ стимулирует выработку проопиомеланокортина.

В то же время другой ключевой регулятор - КРФ, который наряду с АДГ стимулирует выброс АКТГ в кровь, в большинстве исследований на мышцах не изменялся на базальном уровне (van Bodegom et al., 2017). Лишь в нескольких работах на крысах было показано, что уровень мРНК гена *Crh*

был повышен на базальном уровне у взрослых животных с историей раннего постнатального стресса (Aisa et al., 2008; Ladd et al., 2005; Plotsky et al., 2005). Эффект КРФ опосредуется через рецепторы к КРФ первого и второго типа, кодируемые генами *Crhr1* и *Crhr2*. Кроме них ключевую роль в регуляции стрессорного ответа в паравенткулярных ядрах гипоталамуса также играет ГР. Также как и в случае с экспрессией *Crh* в работах на грызунах, ранний постнатальный стресс в большинстве случаев не приводит к изменению уровня мРНК *Nr3c1* (ГР), *Crhr1* и *Crhr2* в гипоталамусе (Arnett et al., 2015; Reshetnikov, 2018; van Bodegom et al., 2017). Это свидетельствует об избирательном изменении отдельных стресс-ассоциированных генов в гипоталамусе после раннего постнатального стресса.

Ранний постнатальный стресс приводит к снижению уровня мРНК *Crhr1* в гиппокампе, поясной, теменной и лобной коре головного мозга, что было показано в работах как на мышах, так и на крысах (Ladd et al., 2005; Reshetnikov, 2018). По всей вероятности, это снижение в уровне экспрессии основного рецептора КРФ позволяет уменьшить передачу сигнала, опосредуемого через них. Уровень мРНК *Nr3c1* также снижался после стресса в раннем возрасте у взрослых животных в базолатеральных и центральных ядрах миндалин (Arnett et al., 2015), гиппокампе (Ladd et al., 2004; van der Doelen et al., 2014a) и фронтальной коре (Navailles et al., 2010a). Устойчивость к стрессу в этих регионах мозга определяется не только уровнем экспрессии ГР, но и соотношением ГР к МР (Berardelli et al., 2013). Было найдено, что соотношение мРНК *Nr3c2/Nr3c1* было повышено в гиппокампе (Ladd et al., 2004; Reshetnikov, 2018) у стрессированных в неонатальный период грызунов. Помимо этого, было найдено также снижение экспрессии гена *Fkbp5*, кодирующего кошаперон ГР, после постнатального стресса во фронтальной коре у крыс (van der Doelen et al., 2014a). Таким образом, изменение экспрессии ключевых генов, вовлеченных в стрессорный ответ в различных регионах мозга, свидетельствует о

комплексном влиянии стресса на ГГНС и о возможном нарушении ее регуляции. Эти изменения могут нести как адаптивный характер, так и патологический, тем самым, способствуя ослаблению механизма отрицательной обратной связи, направленного на подавление стрессорного ответа.

Работы на грызунах демонстрируют, что изменения в поведении и метилировании ДНК могут передаваться в ряду поколений (Gapp et al., 2016). Потомки F1 и F2 от самок мышей C57BL/6 с историей стресса в ранний период жизни (F0) демонстрировали сниженный уровень метилирования промотора гена *Nr3c1* в гиппокампе и усиление его экспрессии. Влияние раннего постнатального стресса на метилирование промоторного региона гена глюкокортикоидного рецептора *NR3C1* было также показано в работах на макаках-резусах и людях (McGowan et al., 2009; Provencal et al., 2012). Таким образом, снижение метилирования отдельных CpG островков *Nr3c1* после стресса хорошо согласуется с повышением экспрессии этого гена. По всей видимости, гипометилирование промотора гена глюкокортикоидного рецептора можно рассматривать как один из механизмов реализации отставленных во времени эффектов стресса. Однако механизмы, запускающие изменение метилирования отдельных CpG островков, остаются не до конца понятны.

1.7.2. Влияние на нейротрофический фактор мозга

Нейротрофический фактор мозга BDNF является регулятором синаптической передачи и пластичности во многих областях центральной нервной системы (ЦНС) (Wang et al., 2022). Уникальная роль BDNF обеспечивается его повсеместной экспрессией в различных регионах мозга, так же, как и его рецептора - TrkB. Универсальность BDNF подчеркивается его вкладом в ряд адаптивных нейронных ответов, включая долговременную потенциацию (LTP), долговременную депрессию (LTD), определенные формы кратковременной синаптической пластичности, а также

гомеостатическую регуляцию нейрональной активности. BDNF участвует в процессах обучения и памяти, а также влияет на поведение, и его экспрессия изменена при множестве психических расстройств (Lu et al., 2008; Martinowich et al., 2007; Schumacher et al., 2005).

Ген *Bdnf* имеет девять 5'-некодирующих экзонов (пронумерованных I-VIII, IXA) и один 3'-кодирующий белок экзон (IX) (Aid et al., 2007). Девять отдельных промоторов контролируют транскрипцию гена *Bdnf*. Различные транскрипты *Bdnf* образуются путем сплайсинга отдельных некодирующих экзонов с экзоном IX. Однако все транскрипты мРНК транслируются в единственный белок pro-BDNF, который протеолитически процессируется с образованием зрелого белка (Aid et al., 2007). Следовательно, специфическая во времени и ткани регуляция экспрессии *Bdnf* контролируется как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровне и необходима для корректного участия BDNF во многих процессах. Транскрипты *Bdnf*, содержащие экзоны I, II, IV и VI, преимущественно экспрессируются в нейронах (Aid et al., 2007; Pruunsild et al., 2007; Rousseaud et al., 2015). Кроме того, эти транскрипты показывают специфическую субклеточную локализацию (Vaj et al., 2013; Vaj et al., 2011).

Стресс в раннем возрасте по-разному влияет на экспрессию различных транскриптов *Bdnf* (Bondar and Merkulova, 2016). Большинство исследований демонстрируют, что длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит к снижению экспрессии различных транскриптов *Bdnf* в гиппокампе (Roth et al., 2009). В тоже время у ювенильных животных с историей раннего постнатального стресса экспрессия IV, IX транскрипта и совокупная экспрессия всех транскриптов *Bdnf* увеличивалась (Biggio et al., 2014; Calabrese et al., 2015; Kundakovic et al., 2013; Nair et al., 2007b; Suri and Vaidya, 2013). Данные по влиянию раннего постнатального стресса на экспрессию *Bdnf* в префронтальной коре противоречивы: в двух исследованиях (Roth et al., 2009; Xue et al., 2013) было

показано снижение уровня мРНК и белка у взрослых животных, в то время как в одном исследовании (Kundakovic et al., 2013) наоборот, было показано усиление экспрессии мРНК *Bdnf*.

Известно, что регуляция промотора *Bdnf* IV зависит от активности нейрона, связана с активацией ионотропных рецепторов глутамата NMDAR, притоком кальция в клетку и активацией белка CREB, связывающегося с цАМФ-чувствительным элементом (Lyons and West, 2011). Экспрессия BDNF также регулируется и глюкокортикоидным рецептором (Suri and Vaidya, 2013). Однако до сих пор не было показано, что в промоторах *Bdnf* были идентифицированы сайты посадки глюкокортикоидного рецептора, поэтому механизм регуляции остается не до конца понятен (Jeanneteau and Chao, 2013). Среди стероидных гормонов в промоторах *Bdnf* был найден лишь сайт посадки для эстрадиола в промоторе IX (Carbone and Handa, 2013).

Снижение экспрессии *Bdnf* в гиппокампе у взрослых животных с историей раннего постнатального стресса может происходить за счет повышенного метилирования промоторов IV и IX гена *Bdnf* (Kundakovic et al., 2013; Roth et al., 2009; Seo et al., 2016). В исследовании (Roth et al., 2009) было найдено, что стресс в раннем возрасте приводит не только к сниженной экспрессии *Bdnf* в префронтальной коре взрослых животных, но и к гиперметилированию промотора *Bdnf*. Причем эти изменения в уровне метилирования сохранялись у самок и в следующем поколении даже при перекрестном воспитании детенышей. Интересно, что данные на человеке демонстрируют, что уровень метилирования ДНК *Bdnf* у пациентов с биполярным расстройством коррелирует с количеством травматических переживаний, перенесенных в детстве (Perroud et al., 2013). Кроме того, у детей, рожденных от матерей с историей раннего постнатального стресса, обнаруживаются изменения в метилировании и экспрессии *Bdnf* в клетках крови, полученных из пуповины, в зависимости от пола младенца и уровня тревожности матери (Pilkaу et al., 2020). Таким образом, возможно, что

эпигенетические изменения в гене *Bdnf*, вызванные ранним постнатальным стрессом способны передаваться между поколениями.

1.7.3. Влияние на процессы миелинизации

Миелиновые оболочки представляют собой электроизолирующие структуры, состоящие из богатых липидами мембран, которые оборачиваются множество раз вокруг аксонов как в ЦНС, так и в периферической нервной системе (Stadelmann et al., 2019). Долгое время считалось, что основные функции миелиновых оболочек заключаются в увеличении скорости проводимости импульса через аксоны. Однако все больше данных свидетельствует о том, что миелинизирующие олигодендроциты участвуют и в других процессах, таких как поддержание энергетического метаболизма аксонов через миелиновые оболочки (Garbern et al., 2002; Saab et al., 2013; Wang et al., 2020b). Процесс миелинизации является критически важным этапом постнатального развития ЦНС, которая обеспечивает эффективную связь нейронных цепей (Nave and Werner, 2014; Schule et al., 2014). В настоящее время установлено, что в нервной системе миелинизация является не одномоментным событием развития, а постоянным процессом *de novo* образования миелина (Ye et al., 1995). Ремоделирование миелиновых оболочек, зависящее от нервной активности является важным компонентом процесса обучения, долговременной нейропластичности (Fields and Bukalo, 2020) и реакции на стресс (Svirin et al., 2022). Нейровоспаление и окислительный стресс могут лежать в основе многих патологических процессов в нервной системе, которые могут быть частично опосредованы через нарушение процессов ремоделирования миелиновых оболочек (Nave and Werner, 2014; Schule et al., 2014; Wang et al., 2020b).

Хронический стресс у грызунов приводит к снижению количества зрелых олигодендроцитов и нарушению процессов миелинизации (Antontseva et al., 2020; Birey et al., 2019; Lehmann et al., 2017; Liu et al., 2018; Yang et al.,

2016). Во многих работах (Bordner et al., 2011; Montalvo-Ortiz et al., 2016; Yang et al., 2017a) было показано, что длительное отделение детенышей от матерей снижает количество зрелых олигодендроцитов в префронтальной коре головного мозга, а также приводит к снижению экспрессии основных генов, связанных с миелинизацией таких как *Mag*, *Mal*, *Mbp*, *Mobp*, *Mog*, *Omg*, *Opalin*.

Интересно, что непосредственно после воздействия стресса у 15-ти дневных детенышей с историей отделения от матерей, наоборот, наблюдалась повышенная экспрессия связанных с миелином генов *Mag*, *Mog* и *Plp1* у щенков (Teissier et al., 2019). Кроме того, оценка цитоархитектуры с помощью иммуногистохимического окрашивания на специфические маркеры показала, что хроническое отделение от матери усиливает пролиферацию зрелых олигодендроцитов уже на 10-й день после рождения и, как следствие, увеличивает количество зрелых олигодендроцитов на 15-й день после рождения с последующим истощением пула зрелых олигодендроцитов у взрослых мышей с историей раннего постнатального стресса (Teissier et al., 2019). Таким образом, по всей видимости, процессы миелинизации сначала активируется под воздействием раннего постнатального стресса, но потом, наоборот, происходит снижение интенсивности процессов миелинизации, которое сопровождается снижением количества зрелых олигодендроцитов. Механизм подобных двухфазных изменений миелинизации под влиянием раннего постнатального стресса пока остается не выясненным.

1.7.4. Влияние на глутаматергическую и ГАМК-эргическую системы

Глутамат является главным возбуждающим нейротрансмиттером в мозге, он осуществляет свои функции через ионотропные и метаботропные рецепторы, которые играют ключевую роль в поддержании синаптической пластичности, в механизмах памяти и обучения (Kessels and Malinow, 2009; Niswender and Conn, 2010; Sanz-Clemente et al., 2013). Известно, что уровень

активности глутаматных NMDA и AMPA рецепторов критичен для процессов синаптической пластичности в таких регионах, как префронтальная кора и гиппокамп, участвующих в формировании памяти на новые объекты (Dere et al., 2007; Warburton et al., 2013). γ -Аминомасляная кислота (ГАМК) является основным тормозным нейротрансмиттером в мозге млекопитающих и регулирует как эндокринные, так и поведенческие реакции на стресс (Collinson et al., 2002; Martijena et al., 2002; Paulsen and Moser, 1998). ГАМК передает сигнал через гетеромерные рецепторы, конформационные изменения которых обеспечивают ток ионов хлора через канал. Было идентифицировано множество подтипов субъединиц, включая $\alpha 1-6$, $\beta 1-4$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , π , θ и $\rho 1-3$ (Barnard et al., 1998; Bonnert et al., 1999). Рецепторы ГАМК могут быть собраны в различные комбинации субъединиц, что приводит к выраженной структурной неоднородности этих рецепторов в головном мозге. Состав субъединиц различается в разных областях мозга (Wisden et al., 1992). В совокупности, регуляция глутаматергической и ГАМК-эргической передачи сигнала в мозге лежит в основе различных видов синаптической пластичности и обеспечивает баланс возбуждающих и тормозных сигналов (Charman et al., 2022).

В нескольких работах на крысах было показано, что длительное ежедневное отделение от матерей, приводит к снижению экспрессии генов *Grin2b*, *Gria1*, *Gria2*, а также гена транспортера глутамата *Eaat1* в гиппокампе (Pickering et al., 2006). Аналогичное снижение экспрессии генов *Grin2a* и *Grin2b* было найдено при использовании другой модели стресса на крысах – суточного отделения на 9-й день жизни (Roceri et al., 2002b). При этом не были обнаружены изменения экспрессии этих генов во фронтальной коре (Pickering et al., 2006; Roceri et al., 2002b). У мышей наоборот, однократное отделение на сутки в возрасте 9-дневной привело у 2-х месячных самцов линии Balb/c к увеличению экспрессии генов субъединиц NMDAR (*Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*) в гиппокампе (Akillioglu et al., 2015). При анализе

транскриптома медиальной префронтальной коры, сделанном на модели длительного отделения от матерей с дополнительным ранним отсаживанием (Maternal Separation with Early Weaning), было выявлено усиление экспрессии генов субъединиц NMDA рецептора (*Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2d*, *Grin3a*) и метаботропных рецепторов (*Grm1*, *Grm4*) (Bordner et al., 2011). В недавней работе было также показано снижение *Grik1* mRNA в миндалинах у взрослых крыс с историей раннего постнатального стресса (Englund et al., 2021). Таким образом, данные по экспрессии генов глутаматных рецепторов достаточно разнородны и зависят от вида животного и используемого типа стресса.

Исследования на крысах демонстрируют, что ДО в детстве привело к усилению экспрессии субъединицы $\alpha 2$ рецептора ГАМК в префронтальной коре и миндалине (Gondre-Lewis et al., 2016). И эти изменения были связаны с усилением импульсивного поведения. В другом исследовании на крысах (Caldji et al., 2000) было показано сниженные уровни рецепторов ГАМК в голубом пятне мозга (*locus coeruleus*) и ядрах одиночного пути (*n. tractus solitarius*) и снижение уровня мРНК субъединицы $\gamma 2$ в миндалине. В заключении, даже однократное отделение детенышей от матерей на 6 часов на 10-й постнатальный день приводит к нарушению работы ГАМК-эргической системы (Hsu et al., 2003). Взрослые животные с историей однократного отделения в раннем возрасте демонстрировали незрелый фенотип ГАМК рецепторов и у них наблюдалась повышенная стресс-реактивность от плавания. Эти результаты демонстрируют повышенную чувствительность развивающейся ГАМК-эргической системы к манипуляциям в ранний постнатальный период.

1.8. Влияние раннего постнатального стресса на стресс-реактивность

При воздействии острого стресса нервная система немедленно реагирует активацией симпато-адреналовой медуллярной системы с последующим высвобождением катехоламинов, адреналина и норадреналина, которые, в свою очередь, стимулируют увеличение частоты

сердечных сокращений и артериального давления (Chrousos, 2009). Эндокринная система также реагирует на острый стресс активацией ГГНС с последующим высвобождением из коры надпочечников кортикостерона у грызунов или кортизола у человека (Chrousos, 2009).

Ряд эпидемиологических исследований убедительно подтверждает связь стресса в раннем возрасте с повышенной предрасположенностью к развитию психопатологии в более позднем возрасте (Lupien et al., 2009a; Nemeroff, 2016). Однако ряд исследований на людях показали, что стресс в детстве может и повышать стрессоустойчивость во взрослом возрасте (Gunnar et al., 2009; Schweizer et al., 2016; Seery et al., 2010). У подростков с историей умеренного стресса в детстве наблюдалась ослабленная реакция на последующие стрессовые события (Shapiro et al., 2015). Исследования на взрослых женщинах с историей стресса в детстве также показало снижение базального уровня кортизола в крови и менее выраженное повышение кортизола в ответ на провокационные стимулы (Voellmin et al., 2015). Напротив, в исследовании на пациентах с депрессией и пограничным расстройством личности, которые перенесли стресс в детстве, был найден повышенный базальный уровень кортизола и отсутствие его снижения после приема дексаметазона, что свидетельствует о нарушении регуляции ГГНС (Carvalho Fernando et al., 2012). Таким образом, в исследованиях на людях наблюдаются противоречивые результаты по эффектам стресса в детстве на последующую стресс-реактивность. По всей видимости несколько факторов, включая характер стресса в детстве (сексуальное или физическое насилие, эмоциональное насилие или пренебрежение), количество эпизодов, кумулятивный период неблагоприятных событий, возраст первого жестокого обращения/пренебрежения и его хронический характер определяют эффекты стресса.

Исследования на грызунах показали, что отделение детенышей от матерей в поздний постнатальный период (с ПД10 по ПД20) приводит к

повышенной восприимчивости к 10-дневному стрессу социальных поражений (Pena et al., 2017). Однако в другом исследовании (Biggio et al., 2014) было показано, что отделение детенышей от матерей в постнатальный период ослабляет влияние социальной изоляции в подростковом возрасте на ГГНС у взрослых крыс, что указывает на то, что постнатальный стресс может оказывать адаптивные эффекты, делая животных менее восприимчивыми к последующим стрессовым воздействиям. Следует отметить, что непоследовательность результатов здесь также может быть связана с длительностью отделения детенышей от матерей. Различные протоколы стрессирования также могут оказывать выраженное влияние на поведения взрослых животных с историей раннего постнатального стресса (Vetulani, 2013).

Данные о влиянии раннего постнатального стресса на последующую реакцию на острый стресс в подростковом и взрослом возрасте также противоречивы. Большинство исследований на крысах и мышах показывают усиление чувствительности к стрессу у мышей с историей раннего постнатального стресса (Biggio et al., 2018; Bonapersona et al., 2019; Dandi et al., 2018; Kember et al., 2012a; Liu et al., 2016; McIlwrick et al., 2016; Sachs et al., 2013; Wang et al., 2012). Другие исследования находят снижение стресс-реактивности у грызунов, перенесших ранний постнатальный стресс (Fuentes et al., 2017; Hsiao et al., 2016; Marrocco et al., 2019; Odeon et al., 2017). Стресс-реактивность наиболее часто оценивается по уровню кортикостерона в крови животных. Различия в эффектах раннего постнатального стресса на стресс-реактивность могут быть частично объяснены типом раннего постнатального стресса, его продолжительностью, возрастом и временем оценки состояния ГГНС после воздействия острого стресса (Korosi et al., 2010; Rice et al., 2008; van Bodegom et al., 2017). Как известно, торможение активации ГГНС обеспечивается за счет отрицательной обратной связи, реализующейся через глюкокортикоидные рецепторы. Нарушение стресс-реактивности может быть

обусловлено нарушением регуляции экспрессии глюкокортикоидных и минералокортикоидных рецепторов и/или их кошаперонов — иммунофилинов FKBP4 и FKBP5 — в гиппокампе и префронтальной коре животных с историей раннего постнатального стресса.

1.9. Модели хронического стресса во взрослом возрасте на животных

Хронический стресс во взрослом возрасте усиливает риск развития психических расстройств. Использование животных моделей хронического стресса открывает новые возможности для исследования молекулярных изменений в головном мозге, связанных с этими психопатологиями. Наиболее широко используемой моделью хронического стресса у экспериментальных животных является модель хронического непредсказуемого стресса (chronic unpredictable stress, CUS). Модель хронического непредсказуемого стресса заключается в ежедневном длительном воздействии на экспериментальных животных ряда непредсказуемых и умеренных стрессоров, направленных на предотвращение привыкания. В зависимости от интенсивности и продолжительности стресса у животных проявляются депрессивноподобные поведенческие изменения, типичные для психических расстройств у человека, например, ангедония, психомоторная заторможенность, беспомощность, нарушения сна и снижение социальных взаимодействий (Willner, 2017). Еще одной моделью хронического стресса у грызунов является длительное содержание в одиночестве (социальная изоляция, social isolation stress). Этот стресс может продолжаться в течение нескольких недель или даже месяцев и вызывает ряд поведенческих аномалий, включая как депрессивное, так и тревожное поведение (Nestler and Hyman, 2010; Weiss et al., 2004). В качестве модели хронического стресса также используется хронический стресс ограничения подвижности (chronic restraint stress), который также может формировать депрессивно-подобный фенотип у грызунов (Joo et al., 2009).

Хронический стресс социального поражения (*chronic social defeat stress, CSDS*) — это наиболее достоверная животная модель депрессии и других тревожных расстройств. Многочисленные исследования показали, что длительное нахождение с агрессором за перегородкой вызывает у мышей депрессивно-подобное состояние, сходное с депрессивными состояниями у людей, со сходством нейрохимических изменений в мозге, а также симптомами, этиологией и чувствительностью к антидепрессантам (Wang et al., 2021; Golden et al., 2011; Nestler and Hyman, 2010). Молекулярные изменения в головном мозге после хронического стресса социальных поражений в значительной степени совпадают с изменениями, наблюдаемыми в постмортальных образцах различных отделов головного мозга пациентов с депрессией (Scarpa et al., 2020). Хронический стресс социальных поражений можно рассматривать не только как модель депрессии, но и как модель посттравматического стрессового расстройства, поскольку у стрессированных животных, помимо поведенческих изменений, проявляются такие симптомы как усиление тревожности и симптомы гипервозбуждения (фрагментация сна), сохраняющиеся длительное время после воздействия стресса и характерные для модели посттравматического стрессового расстройства (Flandreau and Toth, 2018).

Продолжительность хронического стресса социальных поражений коррелирует с тяжестью депрессивноподобного состояния, что согласуется с исследованиями на людях, у которых кумулятивный стресс на протяжении всей жизни связан с более высоким риском депрессии (Vinkers et al., 2014). Длительное воздействие хронического стресса социальных поражений (в течение 21–30 дней) приводит к выраженному депрессивно-подобному поведению, включающему высокий уровень социального избегания, повышение неподвижности в тесте принудительного плавания и ангедоническое поведение по сравнению с животными после 10 дней хронического стресса социальных поражений (Lu et al., 2021). С другой

стороны, после 10 дней хронического стресса социальных поражений только у части животных обнаруживаются поведенческие изменения «восприимчивые к стрессу животные», которые проявляются в виде снижения социального поведения и повышенной тревожности; остальные животные демонстрируют лишь незначительные поведенческие изменения и представляют группу «устойчивые к стрессу животные» (Golden et al., 2011; Nasca et al., 2019).

1.10. Заключение по литобзору

Таким образом, не смотря на интенсивное исследование отставленных во времени эффектов раннего постнатального стресса, молекулярные механизмы, ответственные за поведенческие нарушения и повышенную чувствительность к развитию психопатологий, остаются не до конца ясны. Анализ литературы показал, что многие отставленные во времени эффекты раннего постнатального стресса на экспрессию генов и морфологические изменения в мозге, полученные на различных линиях мышей и крыс, непоследовательны и противоречивы. К причинам наблюдаемой гетерогенности эффектов раннего постнатального стресса можно отнести методологические различия как в протоколе стрессирования, так и в протоколах выделения структуры мозга и протоколах проведения молекулярных исследований.

Проведение значительного количества исследований по эффектам раннего постнатального стресса на людях с привлечением современных нейроимиджинговых подходов позволило лучше понять особенности функционирования мозга после стресса. Но для полного понимания отставленных во времени эффектов раннего постнатального стресса необходимо понимание эпигенетических и транскриптомных изменений в отдельных структурах мозга на животных моделях.

На сегодняшний день большинство исследований эффектов раннего постнатального стресса сосредоточено на оценке экспрессии и

эпигенетических изменений отдельных генов интереса. Такой подход не позволяет комплексно оценить молекулярные изменения, наблюдаемые в структурах головного мозга стрессированных грызунов. Таким образом, выявление отставленных эффектов раннего постнатального стресса на транскриптом и распределения гистоновой модификации H3K4me3 как в нормальных условиях развития, так и после предъявления хронического стресса во взрослом возрасте является актуальной задачей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы, использованные в работе

В работе были использованы следующие материалы: dNTP («Синтол», Россия), ПЦР буфер-Б+EVAGreen («Синтол», Россия), MgCl₂ («Синтол», Россия), ddH₂O («Синтол», Россия), SynTaq ДНК-полимераза с ингибирующей активностью фермента антителами («Синтол», Россия); ДНК-маркер длины 100 п.н. («Медиген», Россия), 50 п.н. («Медиген», Россия), DL-Дитиотриетол («Медиген», Россия), лаурилсульфат натрия («Медиген», Россия); Трис («Sigma», США), Трис-НСl («Sigma», США), спермин («Sigma», США), спермидин («Sigma», США), бромфеноловый синий («Sigma», США), IGEPAL-CA 630 («Sigma», США); деоксихолат натрия («Sigma-Aldrich», Новая Зеландия), Непес («ICNBiomedicalInc.», США); агароза («QBiogene», США); TritonX-100 («Fluka», Швейцария), ЭДТА («Fluka», Швейцария); коктейль ингибиторов протеаз, свободный от ЭДТА («ThermoScientific», США); ацетат Na («Реахим», Россия), NaHCO₃ («Реахим», Россия), KCl («Реахим», Россия); LiCl («Новосибирский завод редких металлов», Россия); фосфатно-солевой буфер (PBS) («Биолот», Россия); гликоген с соосадителем (GlycoBlue™, «Ambion», США); микрококковая эндонуклеаза («New England Bio Labs» (NEB), США), буфер для микрококковой эндонуклеазы (NEB, США), протеиназа К (NEB, США), магнитные частицы (NEB, США); сахароза D (+) («Диа-м», Россия), NaCl («AppliChem Panreac ITW Companies», Германия), антитела («Abcam», Великобритания), Тризол («Ambion», США), гексануклеотидные праймеры («Синтол», Россия), буфер для ревертирования («Bioron», Германия), ингибитор РНКаз («Синтол», Россия), протеиназа К, P8102 («New England BioLabs», США); парамагнитные частицы AMPure XP Beads, A63881 и RNAClean XP Beads, A63987 («Beckman Coulter», США); TRIzol® Reagent, 15596018 («Ambion», США); RNase, R1253 («Thermo Fisher Scientific»,

США); обратная транскриптаза MMLV-RT, E-040 («Синтол», Россия), линейный полиакриламид Linear Polyacrylamide Solution («BIORON GmbH», США).

В работе были использованы следующие модули:

NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (E7490)

NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina

Образцы, приготовленные после обучения, были сделаны с использованием модуля NEBNext® RNA First Strand Synthesis Module

Образцы, приготовленные до обучения, были сделаны с использованием модуля NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Second Strand Synthesis Module

Все модули для приготовления библиотек, использованные в данной работе были приобретены в фирме NEB (США).

Все остальные реактивы отечественного производства квалификации “о.с.ч.” и “х.ч.”

2.2. Животные

Работа выполнена на самцах инбредной линии мышей C57BL/6. Животные содержались в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) при фиксированном световом режиме 12.00:12.00 часов. Стандартный корм (гранулы) и воду животные получали без ограничения. Все процедуры с животными одобрены этической комиссией Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 25 от декабря 2014).

2.3. Экспреиментальный дизайн

Для комплексной оценки эффектов раннего постнатального стресса на поведение, когнитивные способности, структурные и функциональные изменения, а также молекулярные изменения у самцов мышей C57BL/6, в

рамках диссертационной работы было проведено 6 независимых друг от друга экспериментов с животными Рис. 2-3.

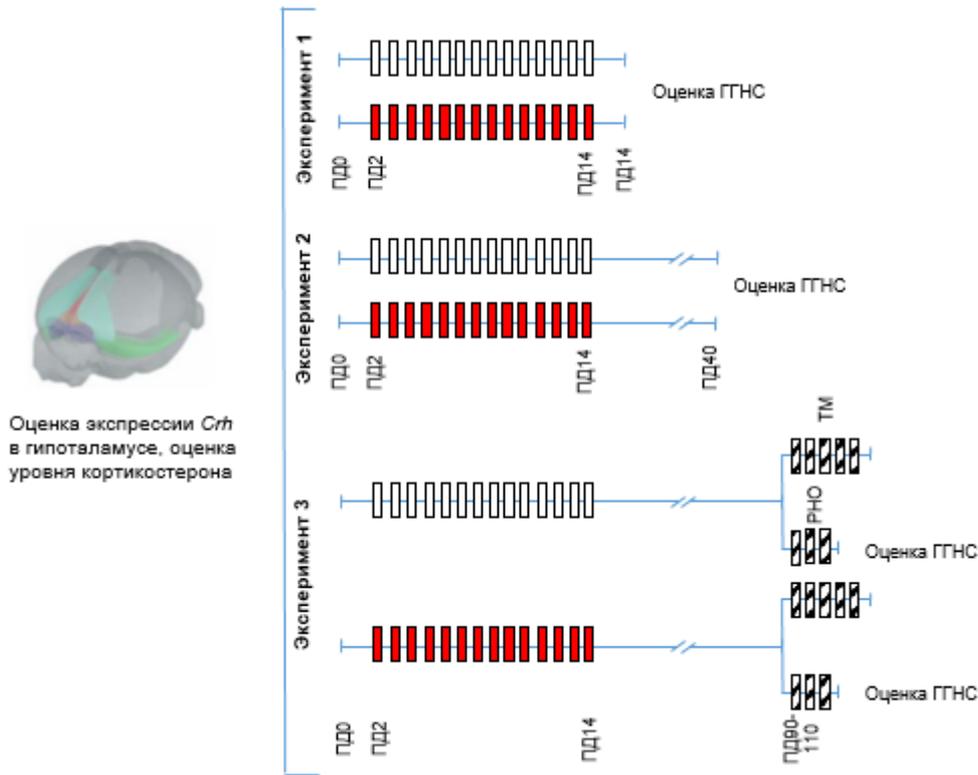


Рисунок 2. Дизайн экспериментов 1-3. ПД- постнатальный день; ТМ – тест Морриса (Morris water maze test); РНО – тест на распознавание нового объекта (novel object recognition test).

В каждом эксперименте использовались самцы мышей с опытом отделения от матери в течение 2-х недель и контрольные животные, содержащиеся в стандартных условиях вивария. В первом и втором эксперименте было оценено влияние раннего постнатального стресса на показатели активности ГНС у 15-ти дневных детенышей - через сутки после прекращения действия стресса и у подростков на 40-й постнатальный день жизни. Эксперименты 3-6 были проведены на взрослых самцах мышей (90-110 постнатальный день жизни). В третьем эксперименте у части взрослых животных был оценен индекс надпочечников, экспрессия гена *Crh* в гипоталамусе и уровень кортикостерона в сыворотке крови, в то время как у другой части животных была оценены параметры обучения и памяти в тесте на распознавание нового объекта (novel object recognition test) и тесте водного

лабиринта Морриса (Morris water maze test). В экспериментах 4 и 5 (Рис. 3) у взрослых животных с опытом раннего постнатального стресса были оценены параметры индивидуального поведения (уровень тревожности, исследовательская и двигательная активность) и параметры социального поведения. После оценки поведения в эксперименте 4 на образцах префронтальной коры головного мозга мышей был проведен транскриптомный анализ (RNA-seq), а в эксперименте 5 на образцах префронтальной коры головного мозга мышей был проведен анализ распределения модификации активного хроматина H3K4me3 с последующим секвенированием в рамках всего генома (ChIP-seq). В заключительном 6-м эксперименте были 3 экспериментальные группы:

- Мыши, подвергнутые длительному отделению в детстве и хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте (ДО+СС группа)
- Мыши, подвергнутые только хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте без истории стресса в постнатальном периоде (СС группа)
- Контрольные животные, не подвергнутые стрессу (К группа)

В этом эксперименте были оценены параметры индивидуального поведения (уровень тревожности), параметры социального поведения и депрессивно-подобного поведения. На материалах префронтальной коры этих животных был проведен как транскриптомный анализ (RNA-seq), так и иммунопреципитация хроматина с антителами к модификации H3K4me3 с последующим секвенированием (ChIP-seq). Следует отметить, что в данном эксперименте как RNA-seq, так и ChIP-seq анализ был проведен на одних и тех же гомогенатах префронтальной коры, что позволило, в дальнейшем, сопоставить результаты этих двух анализов и провести корреляционный анализ между изменениями интенсивности пиков H3K4me3 и уровнем экспрессии гена.

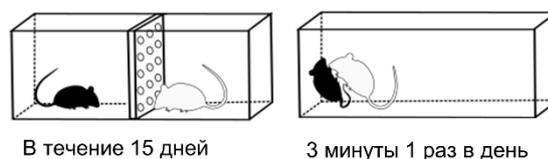
возвращали в гнездо, после чего самку возвращали в домашнюю клетку. Контрольная группа не отделялась от матерей, но подвергалась стандартным процедурам еженедельной чистки клеток, аналогично остальным группам. По достижении детенышами возраста 30-ти дней их отсаживали от матерей и содержали преимущественно однопометными группами в стандартных условиях вивария до начала тестирования.

2.5. Хронический стресс социальных поражений

Для получения мышей с опытом социальных поражений использовали модель сенсорного контакта (Kudryavtseva et al., 1991) с некоторыми модификациями (Bondar et al., 2018a). Эта модель была выбрана как наиболее достоверная животная модель депрессии и других тревожных расстройств. Мышей размещали в металлической клетке (14 × 28 × 10 см), разделенной пополам перфорированной прозрачной перегородкой, позволяющей животным видеть, слышать и обонять друг друга, но предотвращающей физический контакт (Рис. 4). По одну сторону перегородки помещали самца линии C57BL/6, по другую - самца CD1, того же возраста, но более тяжелого по весу (на 3-5 гр). Тестирование начинали через два дня после подсадки животных, после адаптации животных к новым условиям. Ежедневно во второй половине дня металлическую крышку клетки меняли на прозрачную, что позволяло наблюдать за поведением мышей. После пятиминутной адаптации животных к новому освещению, убирали перегородку на три минуты. В это время происходило взаимодействие самцов друг с другом. В большинстве случаев более легкий самец линии C57BL/6 сразу проявлял подчиненное поведение, в некоторых случаях агрессивные взаимодействия происходили с равным успехом. Однако в любом случае, в течение первых 2-3 дней происходило формирование подчиненного типа поведения у самцов линии C57BL/6. В первые три дня не меняли партнеров для закрепления опыта победы или поражения. В последующие дни, после взаимодействия мышей друг с другом, побежденная мышь помещалась в клетку к новому

противнику. Агрессивных самцов не перемещали в новые клетки. В дальнейшей работе использовали самцов с опытом поражений в течение 15 дней (группа ДО+СС). Данная продолжительность стресса была выбрана для получения гомогенной группы животных с устойчивыми изменениями поведенческого фенотипа, однако без выраженного депрессивно-подобного поведения. В качестве контроля использовали самцов, не подвергавшихся воздействию стресса. Перед тестированием контрольных самцов из группы рассаживали по одному в экспериментальные клетки на 5 дней для снятия социальных эффектов группы. Данный контроль является наиболее адекватным для этой модели (Августинович Д.Ф., 2005).

Рисунок 4. Схематическое изображение теста социальных поражений



2.6. Поведенческие тесты

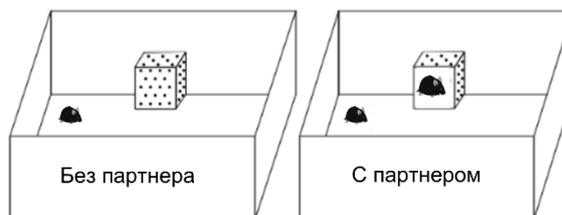
Перед проведением всех поведенческих тестов животных приносили в клетку в комнату для тестирования, где особи адаптировались в течение 5 минут для привыкания к новой окружающей обстановке и освещению. Во время каждого теста проводилась видеосъемка, материалы которой использовались для изучения поведения животных. Для регистрации форм поведения использовались различные программы, такие как BORIS (Behavioral Observation Research Interactive Software) (Friard O., 2016), Ethovision 10.0 (Noldus Information Technology, the Netherlands) или Ethostudio (Friard and Gamba, 2016; Kulikov et al., 2008b).

2.5.1. Тест «социальное взаимодействие»

Социальное поведение оценивали с помощью теста социального взаимодействия, который состоял из двух подходов по 5 минут каждый (Bondar et al., 2018b). В поле, размером 40x40x25 см помещали полый куб

10x10x5 см. с отверстиями, таким образом, что одна стенка куба плотно прилегала к корпусу поля (Рис.5). В центр площадки помещали исследуемую мышь носом к противоположной от куба стенке. В течение первых 5 минут теста (1-й подход) регистрировали: общую пройденную дистанцию, длительность контакта с кубом, время нахождения в зоне взаимодействия (половина поля, на которой расположен куб) и время нахождения в дальней от куба зоне (10 см от дальней стенки). По истечении времени тестирования мышь убирали в нейтральную клетку, в это время внутрь куба помещали незнакомого самца линии C57BL/6. После этого исследуемую мышь снова помещали в центр поля, в течение 5 минут наблюдали за ее активностью (2-й подход) и регистрировали те же параметры.

Рисунок 5. Схематическое изображения теста социального взаимодействия



2.5.2. Тест вынужденного плавания (тест Порсолта)

Тест Порсолта (Porsolt et al., 1977) используется для измерения уровня депрессивно-подобного поведения животного. В прозрачный цилиндр высотой 30 см и диаметром 10 см набирали воды (температура 23-24°C) до высоты 19 см, опускали мышь в цилиндр на 5 минут. Наблюдали за активностью мыши в воде. Сначала животное активно пытается выбраться из стакана, но затем прекращает эти попытки и неподвижно замирает. Считается, что время неподвижности в этом тесте отражает уровень депрессивности особи. Отмечали время начала зависания животного, длительность зависания, длительность активного плавания и длительность

дрейфа животного (мышь удерживает себя на плаву при помощи незначительного движения лапами).

2.5.3. Тест «Открытое поле»

Параметры двигательной, исследовательской активности и уровень тревожности были оценены с помощью теста открытого поля. Поведение животных в течение 5 минут наблюдали в открытом поле размером 70×70 см. Животных помещали в центр поля и фиксировали общее пройденное расстояние, время, проведенное в центре (квадрат 20х20 см.), а также число и длительность вертикальных стоек.

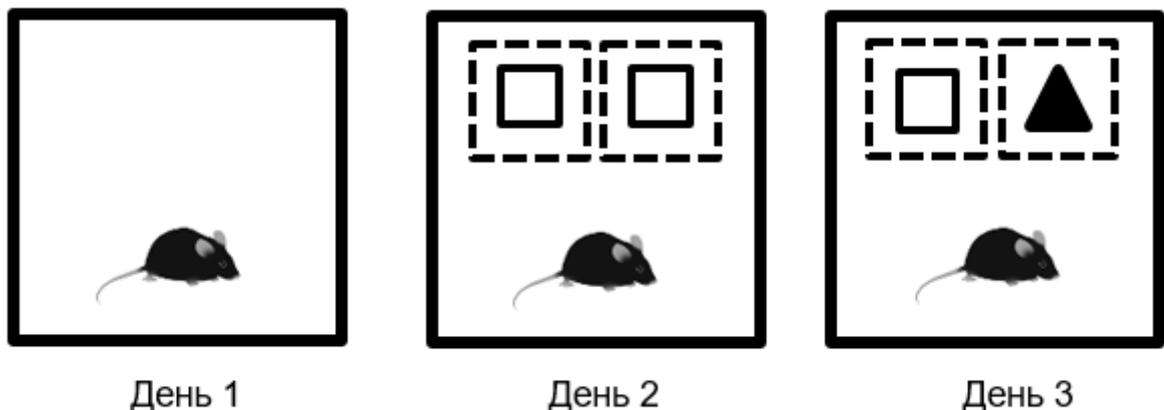
2.5.4. Тест приподнятого крестообразного лабиринта

Тестовая установка состоит из 2 умеренно освещенных открытых (25х5х30см) и двух слабоосвещенных закрытых рукавов (25х5х30), расположенных крестообразно и приподнятых на высоту 50 см. от пола. Эксперимент проводился в затемненной комнате. После 5 минут активации в домашней клетке животное помещалось в лабиринт носом в закрытый рукав. За 5 минут теста регистрировали следующие параметры: число выходов в закрытые, открытые рукава и в центр в виде процента от общего числа входов и выходов; общее время, проведенное в закрытых, открытых рукавах и в центре в виде процента от общего времени тестирования.

2.5.5. Тест распознавания нового объекта (novel object recognition)

Мышей помещали в поле из непрозрачного белого пластика (40 см × 40 см × 25 см), находящееся в отдельной тестовой комнате, на 10 минут ежедневно в течение 3-х тестовых дней (Рис.6). В первый день тестирования, мышь помещалась в пустое поле; во второй день мышь помещалась в поле с двумя одинаковыми объектами; на третий день животное помещали в поле, где один из знакомых объектов был заменен новым. В качестве двух одинаковых объектов использовали синие пластиковые кубики, 5.5 см × 5.5

см × 5.5 см, которые помещались на расстоянии 13 см друг от друга и 8 см от каждой стены по одну сторону квадратного поля. В качестве нового объекта на место правого кубика помещали желтую фигурку Лего, которая имела отличную от кубиков поверхность, форму и цвет. За 5 мин до начала тестирования, каждое животное переносили в тестовую комнату для адаптации к смене помещения. В начале каждой тестовой сессии, мышь помещали в центр поля, головой к стене, противоположной к объектам. После каждого тестирования все объекты и поле тщательно протирали. В тесте анализировались следующие параметры: пройденная дистанция, процент исследованной площади экспериментального поля, число вставаний на задние лапы, время исследования объектов на поле, число подходов к новому объекту, а также индекс распознавания (отношение времени, проведенного в контакте с новым объектом к суммарному времени контакта с обоими объектами). Контакт с объектом определялся автоматически, если



животное находилось на расстоянии менее 4 см от объекта.

Рисунок 6. Схематическое изображения теста распознавания нового объекта (novel object recognition)

2.5.6. Тест водного лабиринта Морриса (Morris' water maze test)

В данном тесте оценивали способность животных к формированию и сохранению пространственной долговременной памяти (Morris, 1984). Водный лабиринт Морриса состоит из бассейна диаметром 100 см, на

внутренних стенках которого были помещены четыре различных равноудаленных пространственных маркера, размещенных таким образом, чтобы бассейн был разделен на 4 сектора (целевой, противоположный, сектор 1 и сектор 2). В целевом секторе бассейна была установлена платформа диаметром 10 см, погруженная ниже на 1-1,5 см поверхности воды. Вода, налитая в бассейн, была подкрашена путем добавления сухого молока, чтобы платформа оставалась незаметной. Температура воды была $24 \pm 1^\circ \text{C}$. Тест состоял из четырех сеансов обучения в день и проводился в одно и то же время суток на протяжении 4 дней (всего 16 попыток). Животное опускали в один из четырех секторов и позволяли в течение 1 минуты найти скрытую под водой платформу. Если животное не могло самостоятельно найти платформу за время теста, экспериментатор помогал ему. После обнаружения платформы экспериментальное животное оставалось там в течение 15 секунд для запоминания пространственных сигналов. После этого мышь отдыхала в клетке в течение 15 сек и проводилась следующая попытка. Каждая попытка начиналась с разного сектора. Расположение платформы в течение всего эксперимента не менялось. На пятый день платформу убрали, а мышь помещали в противоположный сектор и в течение 60 секунд оценивали время, проведенное в каждом секторе. Тест записывался и обрабатывался с использованием программного обеспечения EthoStudio (Kulikov et al., 2008a).

2.7. Иммуноферментный анализ уровня кортикостерона

Для оценки уровня кортикостерона в сыворотке крови для экспериментов 1-3 был применен иммуноферментный анализ. Полученную после декапитации кровь животных центрифугировали дважды в течение 10 минут на 3000g. Полученную сыворотку крови хранили при -70°C . Анализ уровня кортикостерона проводили с помощью коммерческого набора Corticosterone ELISA Kit («Enzo Life Sciences Inc.», США). Оценку уровня

флуоресценции проводили на планшетном спектрофотометре VICTOR3 («Perkin Elmer», США).

2.8. Хроматографический анализ уровня кортикостерона

В эксперименте 6 уровень кортикостерона оценивался в надпочечниках животных. Ткань надпочечников гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвейма на ледяной бане в 1 мл ацетона, в который вносили 10 мкл раствора внутреннего стандарта (11-дезоксикортизол) в метаноле с концентрацией 10 нг/мкл. Гомогенат переносили в пластиковые пробирки объемом 1.5 мл и центрифугировали в течение 10 мин при 11000g (Eppendorf MiniSpin, Eppendorf AG, Германия). Осадок хранили при -20°C для дальнейшего количественного определения белка согласно протоколу Брэдфорда. Супернатант отбирали в чистые пробирки и упаривали досуха в токе азота при 37°C . Сухой остаток растворяли в 20 мкл 30%-ного раствора ацетонитрила в воде с помощью виброэксцентричного метода перемешивания на вортексе (“BioVortex V1”, BIOSAN) в течение 1.5 мин при частоте вращения ротора 2000 об/мин. Полученный раствор фильтровали с помощью пробирок Spin-X с фильтрационной вставкой, диаметр пор - 0.22 мкм (Corning, США). Полученный экстракт использовали для хроматографического анализа.

Измерения проводили с помощью модульной системы для хроматографического анализа Agilent 1200 Series LC. Хроматографию проводили в градиентном режиме элюирования – от 30% ацетонитрила в воде к 60% в течение 8 минут. Скорость подачи элюента составляла 1 мл/мин. Колонка была термостатирована при 30°C . Кортикостерон детектировали на длине волны 246 нм относительно референтной длины волны 600 нм. Расчет количества кортикостерона в ткани надпочечниковой железы осуществлялся по известному количеству внутреннего стандарта в пробе и выражали в нг/мг (нг на мг белка в пробе, измеренного по протоколу Брэдфорда).

2.9. Выделение префронтальной коры головного мозга для молекулярных исследований

Для проведения ChIP-seq и RNA-seq анализа проводили выделение префронтальной коры. После процедуры декапитации, из черепа извлекали головной мозг. Обонятельные луковицы удаляли, префронтальную кору сразу выделяли, как показано на (Рис. 7). Вкратце, область коры (от 0,75 до 3,25 мм от брегмы) вырезали под углом приблизительно 30°. Таким образом, иссеченная область имела каплевидную форму и включала вторичную моторную область, переднюю поясную область, орбитальную область, а также прелимбическую и инфралимбическую области, являющиеся частями префронтальной коры у мышей (Carlen, 2017). Все образцы тканей до использования хранили при температуре -80 °С.

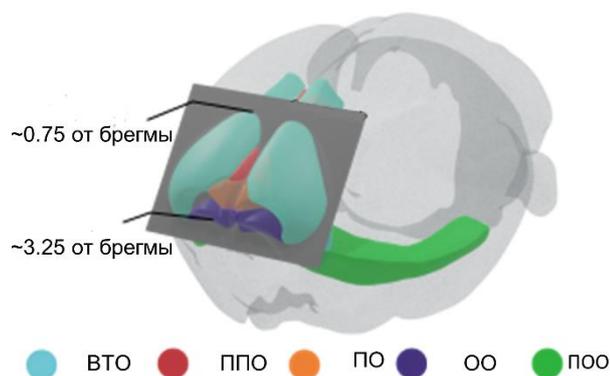


Рисунок 7. Схематическое изображение исследуемой области префронтальной коры. ВТО - вторичная моторная область, ППО – передняя поясная область, ПО – прелимбическая область, ОО – орбитальная область, поо – передняя область островка.

2.10. Выделение РНК

Из замороженных образцов ткани выделяли РНК с использованием Tri-reagent (Invitrogen). Ткань гомогенизировали в 500 мкл Тризола инсулиновым шприцом. К полученному гомогенату добавляли 100 мкл хлороформа, встряхивали пробирки, инкубировали на льду в течение 10 минут. Затем, образцы центрифугировали в течение 10 минут на 10000 g, после чего отбирали супернатант в новую пробирку, не задевая интерфазу. Далее,

добавляли 1 объем изопропанола, линейный полиакриламид в качестве соосадителя и инкубировали ночь на -20°C . Для формирования осадка РНК пробы центрифугировали 10 минут при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ на 14000g. После центрифугирования супернатант отбирали, не задевая осадок, осадок промывали 500 мкл 75% этанолом, чтобы убрать остатки изопропанола. Пробы центрифугировали 5 минут при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ на 7500g. Спирт отбирали, не задевая осадок, и осадок высушивали на воздухе в течение 5-10 минут. Выделенную РНК растворяли в 15 мкл бидистиллированной воды. Очистку проб проводили с помощью парамагнитных частиц (RNACleanXP Beads, Beckman Coulter, США). К выделенной РНК добавляли 1.8X магнитных частиц, тщательно суспендировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Затем, образцы помещали на магнитный штатив на 2-3 минуты. После того, как раствор стал прозрачным, отбирали супернатант, добавляли 200 мкл 80% спирта, инкубировали в течение 1 минуты при комнатной температуре, затем спирт убирали и сушили комплексы «магнитные частицы-РНК» на воздухе. Полученные комплексы растворяли в 14 мкл воды с добавлением диэтилпирокарбоната (DEPC), тщательно перемешивали на вортексе. Далее, образцы помещали на магнит, после чего супернатант с очищенной РНК отбирали в чистую пробирку. Концентрацию РНК измеряли с помощью NanoDrop 2000.

2.11. Реакция обратной транскрипции

Для получения кДНК с очищенной РНК проводили реакцию обратной транскрипции. К 1000 нг РНК добавляли 300 пмоль гексануклеотидных праймеров, доводили бидистиллированной водой до общего объема 8 мкл. Затем раствор тщательно перемешивали пипетированием и сбрасывали на центрифуге, после чего образцы помещали в амплификатор («Eppendorf», Германия) на 5 минут при 70°C и затем сразу помещали в лед на 2 минуты. К образцам добавляли 2,5X реакционную смесь, 0,5 мкл ингибитора РНКаз, 50 ед. фермента MMLV-RT и бидистиллированной воды до 20 мкл. Полученный

раствор тщательно перемешивали и ставили в термостат: на 42°C в течение 50 минут, затем на 70°C в течение 10 минут для ингибирования реакции. После проведения реакции обратной транскрипции образцы разводили до 100 мкл и проводили ПЦР в реальном времени.

2.12. Оценка экспрессии генов с помощью количественного ПЦР анализа

Для оценки экспрессии использовали ПЦР в режиме реального времени. Праймеры для каждого гена подбирали с использованием программы Primer-BLAST (NCBI). В экспериментах 1-3, 6 использовали детекцию продуктов с помощью интеркалирующего красителя, в экспериментах 4 и 5 – использовали ПЦР с детекцией продукта с помощью флуоресцентных зондов. Результаты ПЦР анализировали с использованием $\Delta\Delta C_t$ метода каждую реакцию проводили в трех повторах. Эффективность амплификации каждой пары праймеров составляла от 90% до 110%. Для постановки реакции ПЦР использовали реагенты фирм «Синтол» и «Биолабмикс». Стабильность референсных генов между и внутри групп проверяли с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, USA): величина M стабильности гена была менее 0,5 и коэффициент вариации CV был менее 0.25. Последовательности прямых и обратных праймеров, а также референсных генов домашнего хозяйства (housekeeping genes), использованных в различных экспериментах представлены Таблицах 1-4. Средние значения экспрессии рассчитывались автоматически программой CFXmanager как среднее по $\Delta\Delta C_t$ по трем повторам.

Таблица 1. Последовательность праймеров, использованных для количественного ПЦР анализа в экспериментах 1-3

Название гена		Последовательность 5'-3'	
<i>Crh</i>	<i>Corticotropin releasing hormone</i>	For	GCATCCTGAGAGAAGTCCCTCTG
		Rev	GCAGGACGACAGAGCCACC
		Rev	GGGCAGGTAGTTCTCCTCCT
<i>Hprt*</i>	<i>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl</i>	For	CAAACCTTTCCTTCCCTGGT
		Rev	TCTGGCCTGTATCCAACACTTC

	<i>transferase</i>		
<i>Rps16*</i>	<i>Ribosomal protein 16S</i>	For	AGATGATCGAGCCGCGC
		Rev	GCTACCAGGGCCTTTGAGATGG

*- отмечены референсные гены домашнего хозяйства

Таблица 2. Последовательность праймеров и флуоресцентных зондов, использованных для количественного ПЦР анализа в эксперименте 4

Название гена		Последовательность 5'-3'	
<i>Mbp</i>	<i>Myelin Basic Protein</i>	For	ACACACGAGAACTACCCATTA
		Rev	GGGATGGAGGTGGTGT
		Probe	ROX-ACGGCCGGACCCAAGATGAAA-BHQ2
<i>Mobp</i>	<i>Myelin-associated oligodendrocytic basic protein</i>	For	CAAATGAGAGCAAGACAAGC
		Rev	GAATTCTGGTTCTTGGAGAG
		Probe	ROX-AGAGTTCTGGTTGCCAGACCGG-BHQ2
<i>Mog</i>	<i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i>	For	GAGCAAGCACCTGAATACCG
		Rev	CCGGGGTTGACCCAATAGAA
		Probe	ROX-CTTACCAAGAAGAGGCAGCAATGG-BHQ2
<i>Plp1</i>	<i>Proteolipid Protein 1</i>	For	GTAAAGGACAGAAGAAGGAGAC
		Rev	CTACCAGACATCTAGCACAAC
		Probe	ROX-TGACTTTGCTCAGCTGGAAGGATCC-BHQ2
<i>Enpp6</i>	<i>Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 6</i>	For	TGGTGTGACACCAACTTACTG
		Rev	TCGATGCGCTCATGGTATATG
		Probe	ROX-ATGCAGTTAGCGATGCTCTCGACT-BHQ2
<i>Ugt8a</i>	<i>UDP Glycosyltransferase 8</i>	For	TGCCTCAAATGACCTGCTTG
		Rev	AATGGTCTCCAAACAGTGGGA
		Probe	ROX-TGTATCATGGTGTCCCTGTAGTGG-BHQ2
<i>Gad1</i>	<i>Glutamate Decarboxylase 1</i>	For	CTTCCACTCCTTCGCCTGC
		Rev	CGCCACACCAAGTATCATACG
		Probe	ROX-CCTAATACTACCAACCTGCG -3BHQ2
<i>Slc32a1</i>	<i>Solute Carrier Family 32 Member 1</i>	For	CGCTCCTCTGCCACCCTC
		Rev	CCCGTCTTCGTTCTCCTCG
		Probe	ROX-CGACAAACCCAAGATCACGG -3BHQ2
<i>Slc6a11</i>	<i>Solute Carrier Family 6 Member 11</i>	For	CTACAGTCATGTGTCCCTGC
		Rev	GCCAGGAGACATAATGCCAG
		Probe	ROX-CATGGAGTTCTGGGAACGC -3BHQ2
<i>Grin2a</i>	<i>Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A</i>	For	TGACTTGGGATGGCAAGGAC
		Rev	GGTGGTTGTCATCTGGCTCA
		Probe	ROX-CACTGAGGAAGGCTATCAGG -3BHQ2
<i>Grin2b</i>	<i>Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2B</i>	For	AAGCCTGGCATGGTCTTCTC
		Rev	GTTCGAGCAAGCGTAGGAT
		Probe	ROX-CGCCAATCCGTGATGAACTCC -3BHQ2
<i>Cnp</i>	<i>2',3'-Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase</i>	For	GGTCTTTCTGGAGGAGCTGG
		Rev	GCAGCACACCTGGAGGTC
		Probe	ROX-CAAGAAAGAGCTTCGACAC-3BHQ2
<i>Opalin</i>	<i>Oligodendrocytic Myelin Paranodal And Inner Loop Protein</i>	For	TCTCCAGTTGTCACGAGTGC
		Rev	GGCTCATCATCGATGGTTCT
		Probe	ROX-CAGACTGTGGTCCCTCTATTGG -3BHQ2

Mag	Myelin Associated Glycoprotein	For	ACCTCCAGGAACCTCTATGG
		Rev	CAGGACATGAGGGTTGTCTC
		Probe	ROX-CCTTTCCAGGGAGCACACC-3BHQ2
Robo3	Roundabout Guidance Receptor 3	For	CAGAGCCTTTGGTGACCTGG
		Rev	CCACTCTCTCGTTCTCCAGCC
		Probe	ROX-AGGATCACCATACGTGGAGG-3BHQ2
Gabrb1	Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Beta1	For	CAGCATAGACATGGTCTCGG
		Rev	CAGCTACTCTGTTGTCAAGGG
		Probe	ROX-AGTCTTGGGAAGGACAAGAGGC-3BHQ2
Pclo	Piccolo Presynaptic Cytomatrix Protein	For	GTA CTGAGTGTCAAAGCACCG
		Rev	GCCAGTTCACCTCCAGAG
		Probe	ROX-CCCAATCCTCACTTAACTGAG-3BHQ2
Pik3c3*	Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3	For	GGATTGGCTGGACAGATT
		Rev	CTCCTTGTCATCGCACTT
		Probe	HEX-ACTTGATGGTTGAGTTTCGCTGTGT-BHQ1
Rab22a*	RAB22A, Member RAS Oncogene Family	For	GATACGGGTGTGGGTAAATC
		Rev	CTGGACAGTCTTGGTCATAAA
		Probe	Cy5-AGCATCGTGTGGCGTTTGTG-BHQ2

*- отмечены референсные гены домашнего хозяйства

Таблица 3. Последовательность праймеров и флуоресцентных зондов, использованных для количественного ПЦР анализа в эксперименте 5

Название гена		Последовательность 5'-3'	
Ddias	DNA damage-induced apoptosis suppressor	For	ACTTACGGCCACTGGTTTACA
		Rev	GTGGTCAGTAGGCTCTGAGT
		Probe	ROX-TTTTAATAGAATCTTCAAGGTACCT-3BHQ2
Ndr3	N-myc downstream regulated gene 3	For	TGGCAGACTGTGGAGGACTG
		Rev	GGGTCATGCTGGCAGATGGT
		Probe	ROX-CCTGGGAAGCTCACCGAGGCCT-3BHQ2
Pip4k2a	Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha	For	AATGACTTCATCAATGAGGGCCAAA
		Rev	GTGAATCCCCACCAGGAGGC
		Probe	ROX-ATGTCGAGTTCCTTGACAGT-3BHQ2
Prpc	Prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C)	For	ACGAAGGGGACATTGTCTGG
		Rev	AGGGAAGGGACTCCCCATAG
		Probe	ROX-ATACGGGTTTCATGTGGGATG-3BHQ2
Sdf2	Stromal cell-derived factor 2	For	AGCCACAGTGTGTGAAAGGG
		Rev	CTTCTTCGCCAAAGGCACTC
		Probe	ROX-TCACCTCTCTCTGGAAACCAGGAA-3BHQ2
Supt6h	Transcription elongation factor SPT6	For	TCCTCAAGATCGCACTGCTT
		Rev	ATTCTAAGGCATCCACTGCCA
		Probe	ROX-TCAATGTATGAGTCAGTGCTGTCCC-3BHQ2
Timmdc1	Translocase of inner mitochondrial membrane domain containing 1	For	GAGACGGTTCAGGAGAGAAGG
		Rev	TCAGTGA CTTCAGACTGCTT
		Probe	ROX-TCCACTCTTCCAGCCTCTGCTCG-3BHQ2
Tomm70a	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A	For	GTGCAAAAGCCCATGAGAAGC
		Rev	GCTCTGCTCATTTTGAACCC
		Probe	ROX-TAGAAGACGTCAGTGTGTGT-3BHQ2
Wasl	Wiskott-Aldrich syndrome-like	For	TGTGGGAACAAGAGCTATACAAT
		Rev	GGTCTGTA ACTGCTTTTCGGAAC
		Probe	ROX-AGCTACTTGACAAGTATCTCCAGCA-3BHQ2
Zcchc9	Zinc finger, CCHC domain containing 9	For	CTCTGTGGCTCCGTGGAACA
		Rev	GGCACATCCAGCACGTCTTC
		Probe	ROX-ACCAACCGTGATGATCCGATCTGAG-3BHQ2

<i>Zfp608</i>	<i>Zinc finger protein 608</i>	For	AAGCAGACAGGTGTAGACCCA
		Rev	TCTGGCTTTTGTGGTCCAG
		Probe	ROX-CCATGTCCTTGACTCTGGATCTTGT-3BHQ2
<i>Hprt*</i>	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>	For	CAAACCTTGTCTTCCCTGGT
		Rev	TCTGGCCTGTATCCAACAACCTC
		Probe	ROX-TTGCAAGCTTGCTGGTGAAAAGG-3BHQ2
<i>Rps16*</i>	<i>Ribosomal Protein S16</i>	For	AGATGATCGAGCCGCGC
		Rev	GCTACCAGGGCCTTTGAGATGG
		Probe	ROX-TGCAGTACAAGTTACTGGAGCCTGT-3BHQ2

*- отмечены нормировочные гены домашнего хозяйства

Таблица 4. Последовательность праймеров, использованных для количественного ПЦР анализа в эксперименте 6

Название гена		Последовательность 5'-3'	
<i>Stim2</i>	<i>Stromal Interaction Molecule 2</i>	For	AATCAGCGACCGAAGTCACA
		Rev	TTATGAGGTGGGCGTGTGACAG
<i>Dbp</i>	<i>D-Box Binding PAR BZIP Transcription Factor</i>	For	CCTGAGGAACAGAAGGATGA
		Rev	ATCTGGTTCTCCTTGAGTCTTCTTG
<i>Homer1a</i>	<i>Homer Scaffold Protein 1</i>	For	CAAACACTGTTTATGGACTG
		Rev	TGCTGAATTGAATGTGTACC
<i>Homer1b,c</i>	<i>Homer Scaffold Protein 1</i>	For	TCACTGAGCTGGAGTGTGTTAG
		Rev	GGTACTGCGGAAAGCCTCT
<i>Ciart</i>	<i>Circadian Associated Repressor Of Transcription</i>	For	AAGCAAGCACTTTCCCAG
		Rev	GTGTTTGGCCCATCTTCTC
<i>Mgp</i>	<i>Matrix Gla Protein</i>	For	ACAGGAGAAATGCCAACACC
		Rev	GGTTGTAGGCAGCGTTGTAG
<i>Actb*</i>	<i>Actin Beta</i>	For	TATTGGCAACGAGCGGTTCC
		Rev	TGGCATAGAGGTCTTTACGG

*- отмечены референсные гены домашнего хозяйства

2.13. Иммунопреципитация хроматина с использованием антител к H3K4me3

Для иммунопреципитации хроматина использовался метод нативной иммунопреципитации (без фиксации формальдегидом), который подходит для гистонов и позволяет получить более высокое разрешение пиков при секвенировании (Huang et al., 2006).

Процедуру получения гомогената ткани проводили на льду. К образцу префронтальной коры головного мозга мышей (образец хранили на -70°C) добавляли 250 мкл гомогенизирующего буфера (Таблица 5), 5 мкл коктейля ингибиторов протеаз («ThermoScientific», США) и растирали в стеклянном гомогенизаторе до однородного состояния. К гомогенату ткани добавляли 2000U микрококковой эндонуклеазы. Инкубировали образцы 6 минут в

термошейкере при температуре 37°C, 700 грл. Затем ингибировали действие нуклеазы с помощью добавления 5мкл 0,5 М ЭДТА. Далее разбавляли раствор в 4 раза с помощью добавления 1,2 мл гипотонического лизирующего буфера (Таблица 5). Растворы перемешивали с помощью интенсивного вращения пробирки и помещали на ротатор в холодную комнату на 1 час. Образцы центрифугировали 5 минут при 3000g, отбирали супернатант и переносили в пробирки к промытым магнитным частицам, конъюгированным с G- белком.

Подготовка магнитных частиц. Магнитные частицы, конъюгированные с G- белком, отмывали в 1 мл буфера для иммунопреципитации (Таблица 5). Пробирки помещали на магнитный штатив на 1 минуту. Сливали супернатант, затем повторяли отмывку магнитных частиц еще раз.

Подготовка комплекса «антитела-магнитные частицы» (одновременно с предварительной очисткой)

К магнитным частицам, конъюгированным с белком G, после отмывки добавили 200 мкл 1X буфера для иммунопреципитации и 3 мкл H3K4me3 антител (1 мкг/мкл). Пробирки поместили на ротатор в холодную комнату (+4 °C) на 2 часа. Затем отделяли магнитные частицы с иммобилизованными на них антителами от супернатанта с помощью магнита, супернатант удаляли.

Предварительная очистка (одновременно с подготовкой комплекса «антитела-магнитные частицы»)

К магнитным частицам после отмывки добавили пробу, 105 мкл 10X буфера для иммунопреципитации и 10.5 мкл коктейля ингибиторов протеаз («Thermo Scientific», США). Пробирки поместили на ротатор в холодную комнату на 2 часа. Затем осадил магнитные частицы из супернатанта с помощью магнита, отобрали по 10% от объема супернатанта в отдельные пробирки в качестве контроля количества входящей ДНК (пробы без обработки антителами). Остальной супернатант поместили в пробирки с

комплексами «антитела-магнитные частицы» и инкубировали ночь при температуре 4 °С при постоянном перемешивании.

Отмывку от несвязавшегося хроматина проводили в холодной комнате при температуре +4°С. Пробирки помещали на магнитный штатив, чтобы отделить магнитные частицы от супернатанта, сливали супернатант. Промывку магнитных частиц проводили последовательно с помощью добавления 1 мл низкосолевого буфера, высокосолевого буфера, LiCl буфера и TE буфера (Таблица 5), процедуру повторяли дважды с каждым буфером.

Готовили свежий элюирующий буфер, добавляли по 100 мкл буфера на каждый образец, после интенсивно перемешивали. Помещали пробирки в термошейкер на 1 час при температуре 65°С, 800 rpm. Затем отделяли супернатант от магнитных частиц при помощи магнита и собирали его в чистую пробирку. Дополнительно промывали магнитные частицы добавлением 100 мкл элюирующего буфера, помещали пробирки на магнит, супернатант собирали в первоначальную пробирку с элюатом.

К полученным преципитатам добавляли 0,5М ЭДТА до концентрации 100 мМ, 1 М Трис-НСl (рН 6,5) до концентрации 60 мМ, 10 мг/мл протеиназы К до концентрации 0,5М. Инкубировали 3 часа при температуре 52°С. За 20 минут до окончания инкубации добавляли 1 мкл 20 мг/мл РНКазы. К пробам без обработки антителами добавляли 5X лизис буфер для протеиназы К (Таблица 5), 10 мг/мл протеиназы К до концентрации 0,5М. Инкубировали 3 часа при температуре 52°С. За 20 минут до окончания инкубации добавляли 1 мкл 20 мг/мл РНКазы. С образцами проводили экстракцию фенол-хлороформом, затем проводили осаждение ДНК.

Таблица 5. Буферы, используемые для иммунопреципитации хроматина с использованием антител к H3K4me3

1X буфер для гомогенизации	10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 4 мМ MgCl ₂ , 1 мМ CaCl ₂
1X Гипотонический лизирующий буфер	0.2 мМ ЭДТА, 1.5 мМ DL-Дитиотриетол (ДТТ)
1X буфер для иммунопреципитации	20 мМ Трис-НСl рН 8, 0.2 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 0.1% Тритон X-100

1X Низко солевой буфер	0.1% лаурилсульфат натрия (SDS), 1% Тритон X-100, 2 mM ЭДТА, 20 mM Трис (pH 8.0), 150 mM NaCl
1X Высоко солевой буфер	0.1% лаурилсульфат натрия (SDS), 1% Тритон X-100, 2 mM ЭДТА, 20 mM Трис (pH 8.0), 500 mM NaCl
1X LiCl буфер	1% IGEPAL-CA 630, 1% дезоксихолевая кислота, 1 mM ЭДТА (pH 8.0), 10 mM Трис-HCl (pH 8.0), 0.25 M LiCl
1X TE буфер	10 mM Трис (pH 8.0), 1 mM ЭДТА
1X Буфер для элюции хроматина	100 mM NaHCO ₃ , 1% лаурилсульфат натрия (SDS)
5X Лизирующий буфер для протеиназы К	500 mM Трис-HCl, 1M NaCl, 25 mM ЭДТА, 1% лаурилсульфат натрия (SDS)

Для анализа обогащения для каждого образца и исходных данных (инпут) проводили количественный ПЦР анализ в реальном времени с праймерами положительного и отрицательного контроля. В качестве положительного контроля была выбрана промоторная область гена *Rpl30*, расположенная в пределах активного хроматина и обогащенная H3K4me3 по данным UCSC Genome Browser. В качестве отрицательного контроля использовали промоторную область гена *Oosp3*, который экспрессируется только в ооцитах и в его регуляторной области нет пиков H3K4me3 в префронтальной коре мышей (данные UCSC Genome Browser). Были подобраны следующие пары праймеров: прямой *Rpl30* – 5'-ACTTTGCACAGGGACCACAA, обратный – 5'-TTACCCGTCAGCCACTTCAC; *Oosp3* прямой – 5'-ACAGCATTTGTGTCAGCATCCCTAAA, *Oosp3* обратный – 5'-GCCTGAATATGCTTGTCTAGGTGGC. Для каждого образца оценивали степень обогащения (FE): $FE = 2^{(Ct_{Inp} - Ct_{IP})_{pos}} / 2^{(Ct_{Inp} - Ct_{IP})_{neg}}$. Для подготовки библиотеки использовали только образцы с FE > 25.

2.14. Приготовление библиотек для секвенирования

2.14.1. Подготовка ДНК-библиотек из иммунопреципитатов

ДНК-библиотеки для ChIP-seq были подготовлены с помощью набора реактивов NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, США). Подготовка концевых участков ДНК:

К иммунопреципитатам добавили 3.5 мкл 10X буфера для репарации концов ДНК, 1.5 мкл смеси ферментов для репарации концов ДНК, 9 мкл бидистиллированной воды. Инкубировали образцы в термостате в течение 30 минут при 20 °С, затем 30 минут при 65 °С.

1) Лигирование адаптора:

Добавили к образцам с восстановленными концами 2.5 мкл адаптора, 15 мкл мастер микса для лигирования адаптора, 0.5 мкл энхансера. Поместили смесь в термостат на 15 минут при 20 °С. Затем добавили 3 мкл USER™ фермента, перемешали раствор и инкубировали в течение 15 минут при 37 °С.

2) Сортировка ДНК по размеру:

На данном этапе был произведен отбор ДНК размером около 200 п.н. Отбор производился с помощью магнитных частиц (AMPure XP beads, Beckman Coulter, США). Для этого к образцам добавили 20 мкл магнитных частиц (40% от общего объема пробы), тщательно пипетировали раствор. Пробы оставили на 5 минут при комнатной температуре. Затем поместили образцы на магнитный штатив для отделения частиц от супернатанта. После того, как раствор стал чистым, перенесли супернатант в чистые пробирки. Добавили 10 мкл магнитных частиц (20% от общего объема), тщательно пипетировали раствор. Оставили образцы при комнатной температуре на 5 минут. После поместили на магнитный штатив для отделения магнитных частиц от супернатанта. После того, как раствор стал чистым, удалили супернатант. Добавили 200 мкл 80% этилового спирта, инкубировали в течение 30 секунд, после удалили спирт. Повторили промывку образцов этанолом еще раз. Полностью удалили остатки этилового спирта, оставили пробирки с открытой крышкой при комнатной температуре до полного высыхания этанола и подсушивания магнитных частиц. Как только частицы посветлели, добавили 12.5 мкл бидистиллированной воды. Ставили образцы при комнатной температуре на 2 минуты. Затем поместили пробы на

магнитный штатив, после того, как раствор стал чистым, перенесли 10 мкл супернатанта в чистую пробирку для ПЦР-обогащения библиотеки и 1 мкл в пробирку для проверки количества получившейся библиотеки.

3) ПЦР-обогащение ДНК-библиотек:

К библиотекам добавили 15 мкл смеси для ПЦР, 2.5 мкл i5 индекс-праймера и 2.5 мкл i7 индекс-праймера (для каждой библиотеки использовали свой набор индекс-праймеров), 10 мкл ПЦР микса и проводили ПЦР. Реакция включала в себя начальную денатурацию при 98 °С в течение 30 секунд, последующими 8 циклами амплификации (для библиотек с низкими концентрациями ДНК проводили 10 циклов амплификации), включающими в себя денатурацию при 98 °С в течение 10 секунд, отжиг праймеров при 65 °С в течение 75 секунд, затем финальная элонгация при 65 °С в течение 5 минут. После была проведена очистка образцов при помощи магнитных частиц.

4) Очистка образцов с помощью AMPure XP beads:

К образцам добавили 27 мкл магнитных частиц (90% от общего объема раствора), пропипетировали. Оставили при комнатной температуре на 5 минут. Поместили образцы на магнитный штатив для отделения магнитных частиц от супернатанта. После того, как раствор стал прозрачным, удалили супернатант. К магнитным частицам добавили 200 мкл 80% этилового спирта, инкубировали образцы при комнатной температуре в течение 30 секунд, затем удалили спирт. Повторили отмывку этанолом еще раз. После оставили пробирки с образцами с открытой крышкой при комнатной температуре до полного удаления спирта и подсушивания частиц. Как только магнитные частицы посветлели, добавили 21.5 мкл бидистиллированной воды. Оставили при комнатной температуре на 2 минуты. Затем поместили пробирки на магнитный штатив для отделения магнитных частиц от супернатанта. После того, как раствор стал прозрачным, перенесли 20 мкл супернатанта в чистую пробирку.

Для второго этапа очистки к образцам добавили 20 мкл магнитных частиц (100% от общего объема пробы), повторили очистку, как было описано ранее.

Качество библиотек и размер получившейся вставки анализировали с использованием Agilent Bioanalyzer. Концентрацию библиотек определяли с помощью Qubit 2.0. Библиотеки были пулированы в эквимольном количестве и секвенированы на HiSeq Illumina 4000 в ЗАО «Евроген».

2.14.2. Подготовка библиотек для RNA-seq

Для приготовления библиотек использовали методику полиА-селекции мРНК (#E7420 NEBNext Poly(A) mRNA magnetic isolation module NEB, США) с использованием набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (# E7760, NEB, США).

Изоляцию мРНК из раствора проводили с помощью магнитных частиц с адсорбированными олиго-d(T)₂₅. Магнитные частицы (20 мкл) отмывали в 2X RNA Binding буфере дважды на магнитном штативе. После чего ресуспендировали в 50 мкл RNA Binding буфера, затем добавляли образцы выделенной РНК и доводили бидистиллированной водой до 100 мкл. Пробирки ставили в термостат на 5 минут при 65°C для денатурации РНК, затем резко охлаждали до 4°C. Для улучшения образования комплексов «мРНК-магнитные частицы» пробы ресуспендировали пипетированием, инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, повторяли процедуру дважды. Образцы инкубировали на магнитном штативе, в течение 2 минут для отделения комплексов от раствора, сливали супернатант. Для отмывки комплексов, к образцам добавляли 200 мкл промывочного буфера, инкубировали на магнитном штативе в течение 2 минут, процедуру отмывки повторяли дважды. Затем, к образцам добавляли 50 мкл буфера для элюции, ставили в термостат: на 2 минуты при 80°C, далее на 25°C для элюции поли-А мРНК с магнитных частиц. К пробам добавляли 50 мкл 2X Binding буфера для повторного связывания мРНК с магнитными частицами. Комплексы

инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, повторяли процедуру дважды. Образцы инкубировали на магнитном штативе, в течение 2 минут для отделения комплексов от раствора, сливали супернатант и проводили отмывки, как описано ранее. Фрагментацию РНК проводили при нагревании с помощью щелочного гидролиза. Предварительно смешав реакционный буфер для достройки первой цепи и случайные гексануклеотидные праймеры, к мРНК добавляли 17 мкл приготовленной смеси, сразу инкубировали при 94°C в течение 10 минут, затем помещали образцы в лед и на магнитный штатив. Очищенную фрагментированную мРНК из раствора элюировали с магнитных частиц добавлением 15 мкл ddH₂O в новую пробирку. Для синтеза первой цепи кДНК к 15 мкл пробы добавляли необходимые реагенты до объема 20 мкл. Реакцию обратной транскрипцию проводили при следующих условиях: 10 минут при 25°C, 15 минут при 42°C, 15 минут при 70°C, охлаждали до 4°C. Для синтеза второй цепи кДНК к смеси добавляли 10X реакционный буфер и 4 мкл смеси ферментов для синтеза второй цепи, доводили бидистиллированной водой до общего объема 80 мкл, тщательно перемешивали. Ставили в термостат на 1 час при 16°C. Очистку кДНК проводили с использованием 1,8X магнитных частиц (Agencourt AMPure XP beads, Beckman Coulter, США), как описано ранее. Элюцию кДНК с магнитных частиц проводили в 54 мкл бидистиллированной воды, затем 50 мкл очищенной кДНК снимали в чистую пробирку. Дальнейшее приготовление библиотек было аналогичным приготовлению ДНК-библиотек (п.2.16.1).

2.15. Статистическая обработка данных

Статистические расчёты производились с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для сравнения 2-х групп был использован Т-тест Стьюдента, для сравнения трех и более групп использовали метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным сравнением с использованием критерия Fisher's

LSD. Оценка параметров теста на распознавание нового объекта проводилась с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с факторами «длительное отделение» и «день теста». Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($p < 0.05$), о тенденции говорили в том случае, если уровень значимости был равен $p < 0.1$.

2.16. Биоинформатический анализ данных секвенирования

Обработка данных секвенирования проводилась к.б.н. Ершовым Н.И.

2.18.1. Анализ данных RNA-seq

Предобработка данных секвенирования библиотек RNA-seq, представленных парными прочтениями, включала удаление адаптерных последовательностей и участков низкого качества с помощью программы Trimmomatic (v0.36). Предобработанные данные были картированы программой hisat2 (v2.1.0) на референсную сборку генома мыши версии GRCm38/mm10, используя аннотацию генов GENCODE версии M15 и прочие параметры по умолчанию. Оценку качества данных проводили с помощью пакета программ PicardTools (v2.4.1) - проведен поиск потенциальных ПЦР-дубликатов (SortSam и MarkDuplicates) и собраны метрики качества для каждой библиотеки (CollectRnaSeqMetrics). Суммарное число прочтений, картированных на каждый ген в каждом образце, было получено с помощью программы FeatureCounts (v1.5.2). Дальнейший анализ полученных значений производился в программной среде R/BioConductor. Нормализация данных на глубину секвенирования и анализ дифференциальной экспрессии генов между экспериментальными группами проводился с помощью пакета DESeq2 (v1.16.1). Значимыми принимались различия при пороге достоверности дифференциальной экспрессии $p\text{-value} \leq 0,05$ после коррекции на множественные сравнения методом Бенджамини-Хохберга.

2.16.2. Анализ данных ChIP-seq

После удаления адаптерных последовательностей (adaptor trimming) данные секвенирования были картированы на геном мыши GRCm38/mm10 при помощи программы Bowtie2. Качество библиотек оценивали с помощью Phantompeakqualtools

(<https://www.encodeproject.org/software/phantompeakqualtools/>). Для детекции широких ("broad") и узких ("narrow", нуклеосомных) пиков использовали алгоритм MACS2 с оптимизированными параметрами для нуклеосом (-shift 37 -extsize 73). В качестве фоновых значений принимали данные секвенирования образца «инпут». Для ассоциации выявленных пиков с сайтами начала транскрипции генов (TSS) использовали аннотацию GENCODE release M13 (GRCm38.p5, <https://www.encodegenes.org>). Пики, попадающие в районы DAC blacklisted (ENCODE-присоединение ENCFF547MET), были исключены из последующего анализа. Нормализация, моделирование и статистическая обработка выполнялись с использованием параметров по умолчанию. Для анализа дифференциального обогащения (DE) использовали DESeq2 со значением параметра MAPQ не менее 10.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Влияние раннего постнатального стресса на ГГНС у самцов мышей различных возрастов

Мы оценили экспрессию гена *Crh* в гипоталамусе, уровень кортикостерона в сыворотке крови и относительный вес надпочечников у детенышей (ПД15), подростков (ПД40) и взрослых (ПД90) самцов мышей C57BL/6. Мы нашли, что в каждой возрастной точке мыши с историей раннего постнатального стресса имели более высокий уровень экспрессии *Crh* в гипоталамусе (Рис. 8). Однако из-за высокого уровня гетерогенности значений в ДО группе эти значения не достигали достоверных различий ($p > 0.05$). Влияние постнатального стресса на относительный индекс надпочечников также не было выявлено. Таким образом, ДО не оказал значимого влияния на базальную активность ГГНСни в одном из исследованных возрастов.

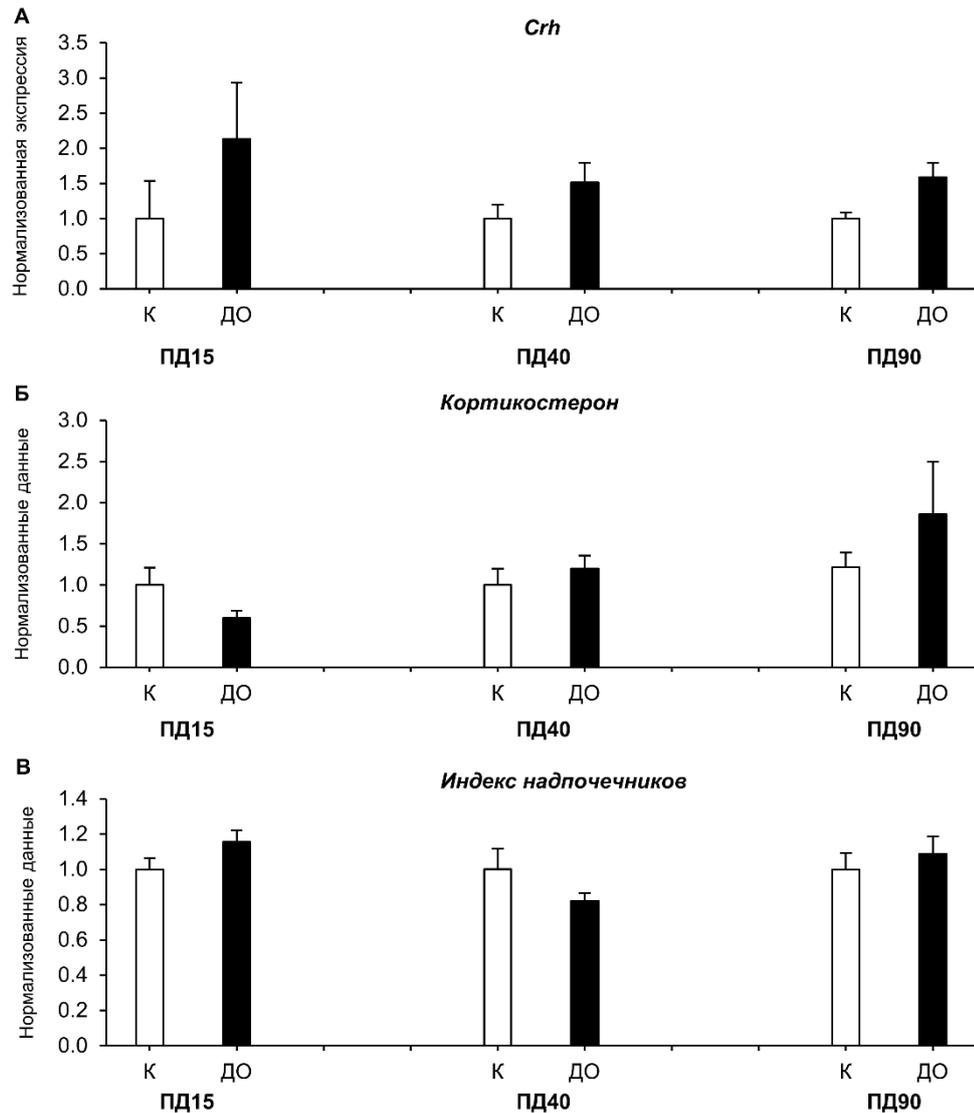


Рисунок 8. Характеристики активности ГНС после раннего постнатального стресса у самцов C57BL/6 в различных возрастах.

А. Экспрессия *Crh* в гипоталамусе; **Б.** Уровень кортикостерона в сыворотке крови; **В.** Относительный вес надпочечников. Данные по каждой группе были нормализованы на среднее значение по контрольной группе (средние значения контрольной группы приняты за 1). Данные представлены как нормализованные значения \pm ошибка среднего. Данные по экспрессии генов были оценены как ΔC_t , в качестве генов домашнего хозяйства были использованы гены *Hprt* и *Rps16*. Белый столбик – группа контроля, К; черный столбик – группа длительного отделения, ДО. В группах было по 6-10 животных.

3.4. Влияние раннего постнатального стресса на поведение взрослых животных

Поведение животных тестировалось в 2-х независимых друг от друга экспериментах (Эксперимент 4 и 5, рис. 3), в каждом из которых животные

тестировались в идентичной батарее тестов, и некоторые поведенческие тесты были проведены в Эксперименте 6, где животным с РПС во взрослом возрасте был предъявлен дополнительный стресс социальных поражений (Рис 3). Мы проанализировали эти данные совместно, что позволило нам выявить стабильные изменения, независимые от эксперимента (Рис.9). Мы нашли, что мыши группы ДО демонстрировали тенденцию к снижению двигательной активности в тесте открытого поля [эксперимент 4: $t(25)=1.75$, $p = 0.093$; эксперимент 5: $t(16)=2.26$, $p = 0.039$, Рис. 9б]. В то же время постнатальный стресс не оказал достоверного влияния на параметры тревожного поведения (время нахождения в центре в тесте открытого поля и время нахождения в закрытых и открытых рукавах в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, Рис. 9а) и параметры социального поведения (время контакта с партнером в тесте социального взаимодействия, Рис. 9в).

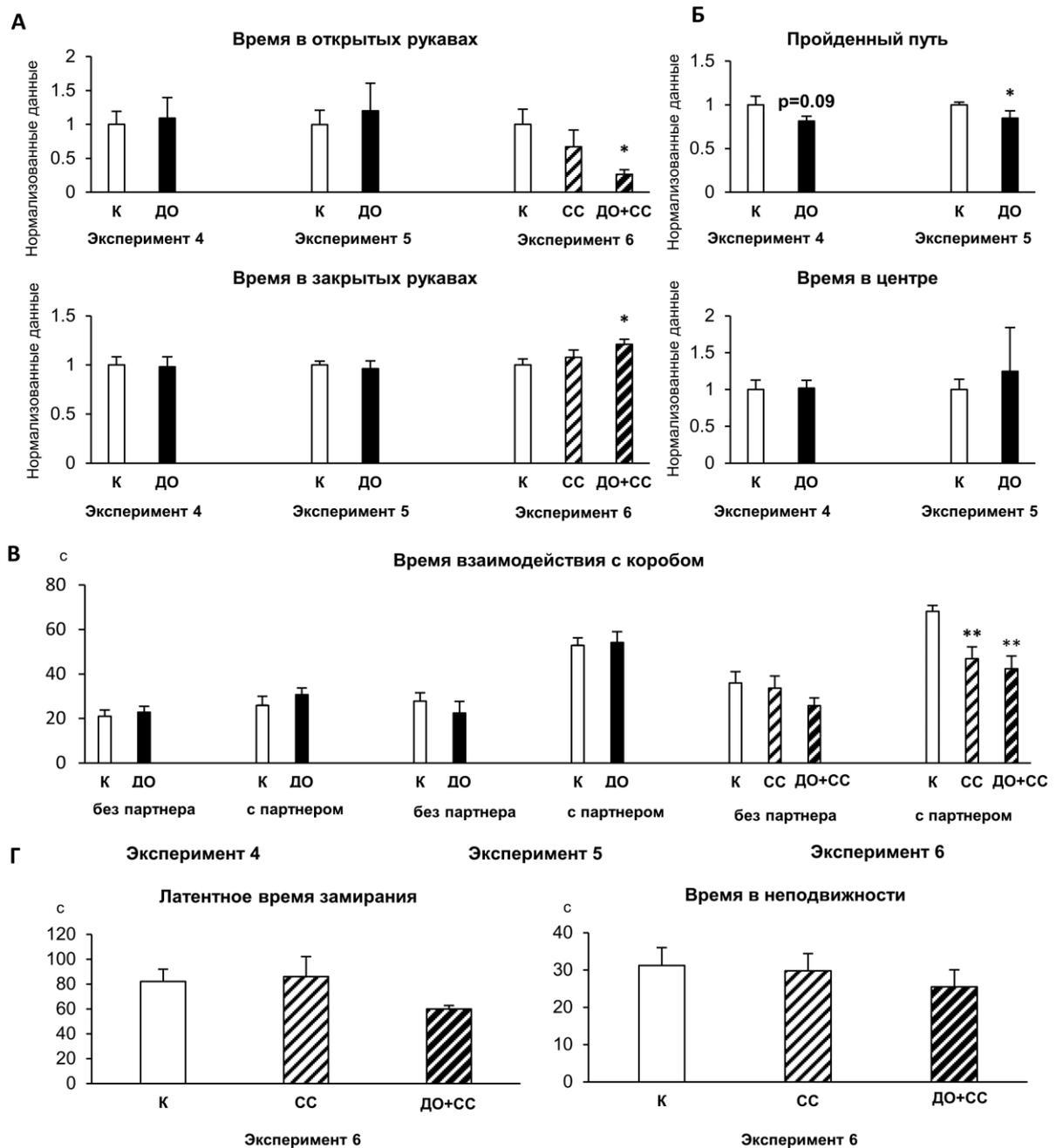


Рисунок 9. Оценка параметров индивидуального и социального поведения у взрослых самцов C57BL/6 историей раннего постнатального стресса. **А.** Результаты по времени нахождения животных в открытых и закрытых рукавах в тесте приподнятого крестообразного лабиринта; **Б.** Оценённые параметры теста «открытое поле»; **В.** Время взаимодействия с коробом с партнером и без партнера в тесте социального взаимодействия; **Г.** Параметры депрессивно-подобного поведения в тесте вынужденного плавания (тест Порсолта). На рисунках А-Б данные по каждой группе были нормализованы на среднее значение по контрольной группе (средние значения контрольной группы приняты за 1). Данные представлены как нормализованные значения \pm ошибка среднего; На рисунке В-Г представлены абсолютные значения в секундах (средние значения \pm ошибка среднего). К – контроль, ДО – группа с длительным отделением в детстве; СС – группа, подвергнутая стрессу

социальных поражений в течение 10 дней; ДО+СС – группа с историей стресса в ранний постнатальный период и подвергнутая стрессу социальных поражений в течение 10 дней во взрослом возрасте. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ в сравнении с контрольной группой (*post hoc* анализ с использованием критерия Fisher's LSD). В каждой группе было по 6-12 животных.

В эксперименте 6 взрослые животные обеих групп (ДО и К) были подвергнуты хроническому стрессу социальных поражений в течение 14 последовательных дней. Социальный стресс оказал влияние на время контакта с партнером в тесте социального взаимодействия [$F(2, 24) = 8.10$, $p = 0.002$] и время нахождения открытых рукавах в приподнятом крестообразном лабиринте [$F(2, 24) = 3.92$, $p = 0.036$]. Животные обеих групп (СС и ДО+СС) демонстрируют снижение социального поведения по сравнению с контролем ($p < 0.01$). При этом животные с комбинацией стрессов (ДО+СС) также демонстрировали выраженное снижение времени (на 64%), проведенного в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта ($p = 0.011$) по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что часть отставленных во времени негативных эффектов раннего постнатального стресса (снижение локомоторной активности) проявляется в умеренно-стрессовых ситуациях (тест открытого поля), другие эффекты (усиление тревожности) наблюдаются только при дополнительном сильном стрессовом факторе (социальный стресс).

3.5. Влияние раннего постнатального стресса на обучение и память

3.5.1. Тест водного лабиринта Морриса

В тесте водного лабиринта Морриса было исследовано пространственное обучение. Для этого оценивали время нахождения скрытой под водой платформы. Как контрольные животные, так и животные с опытом стресса в раннем возрасте показали типичную кривую обучения (Рис. 10А), с каждой последующей попыткой им требовалось меньше времени для

нахождения платформы [$F(1,15)=5,37$, $p<0.001$]. Значимых различий в параметрах обучения между группами не было найдено ($p>0.05$). Параметры долговременной пространственной памяти были оценены по времени, проведенном в целевом секторе после удаления платформы. Мы не нашли значимых различий между группами по времени в целевом секторе ($p>0.05$). Однако при анализе времени, проведенном в каждом секторе, только контрольная группа демонстрировала выраженное предпочтение целевого сектора [$F(3,27) = 2,99$, $p = 0.041$], в то время как ДО группа не отдавала предпочтение ни одному из секторов [$F(3,27) = 1.03$, $p=0.38$] (Рис. 10Б) Таким образом, ранний постнатальный стресс оказал отставленные во времени влияния на долговременную пространственную память в тесте водного лабиринта Морриса.

3.5.2. Тест на распознавание нового объекта

В первый день теста влияния раннего постнатального стресса на исследовательскую (исследованная территория) и двигательную активность (пройденное расстояние) не было выявлено ($p>0.05$). На второй и третий день теста как контрольные животные, так и животные с опытом стресса в раннем возрасте показали снижение пройденной дистанции и процента исследованной площади экспериментального поля (Рис. 10Г) по сравнению с первым днем тестирования. Снижение двигательной и исследовательской активности может быть связано с реакцией на новые объекты, помещенные в поле. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил достоверное влияние факторов «длительное отделение» и «день теста» на процент исследованной площади экспериментального поля («длительное отделение» – $F(1,13)=3.22$, $p=0.040$, «день теста» - $F(2,13)=45.53$, $p<0.001$, «длительное отделение x день теста» – $F(4,27)=2.86$, $p<0.035$), пройденную дистанцию («длительное отделение» – $F(1,13)=8.54$, $p=0.035$, «день теста» – $F(2,13)=55.45$, $p<0.001$) и вставания на задние лапы («длительное отделение» – $F(1,13)=8.76$, $p=0.002$, «день теста» – $F(2,13)=10.93$, $p=0.003$). Длительное

отделение от матерей приводит к снижению процента исследованной площади экспериментального поля по сравнению с контрольной группой животных на 2-й и 3-й дни (день 2: $p=0.002$, день 3: $p=0.027$). Также у группы ДО наблюдалось снижение пройденной дистанции (день 2: $p<0.001$; день 3: $p=0.008$) и снижение числа вставаний на задние лапы (день 2: $p=0.014$, день 3: $p=0.036$) по сравнению с контрольной группой. На третий день теста при оценке способности к распознаванию нового объекта было найдено, что мыши ДО имеют более низкий индекс распознавания [$t(14)=4.75$, $p=0.029$] и реже подходят к новому объекту [$t(14)=4.55$, $p=0.033$] по сравнению с контрольной группой. Таким образом, группа ДО показала снижение двигательной и исследовательской активности, нарушения в распознавании нового объекта, демонстрируя черты неофобии.

Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего; К – контроль, ДО – группа с длительным отделением от матерей в раннем возрасте. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$ в сравнении с контрольной группой; ## - $p < 0.01$ по сравнению с целевым сектором. По 6-12 животных в каждой группе.

3.6. Влияние раннего постнатального стресса на транскриптом префронтальной коры головного мозга взрослых самцов мышей

У взрослых самцов мышей с опытом длительного отделения от матерей и контрольных животных была выделена префронтальная кора и приготовлены библиотеки для RNA-seq (по 4 животных на группу). Секвенирование проводилось на платформе Illumina 4000. В среднем на каждую библиотеку было получено 29 миллионов парных прочтений. Все библиотеки были хорошего качества, количество рибосомальных прочтений не превышало 0.5%, более 95% прочтений в каждой библиотеке уникально картировались на геном мыши (Приложение 1).

Анализ дифференциально экспрессирующихся (ДЭ) генов с применением DESeq2 выявил значительные изменения в экспрессии генов – в группе с длительным отделением от матерей изменилось 648 генов по сравнению с контролем (342 down, 306 up). Анализ главных компонент показал, что первая компонента, включающая 27% вариации, делит образцы по наличию/отсутствию опыта раннего постнатального стресса (Рис. 11).

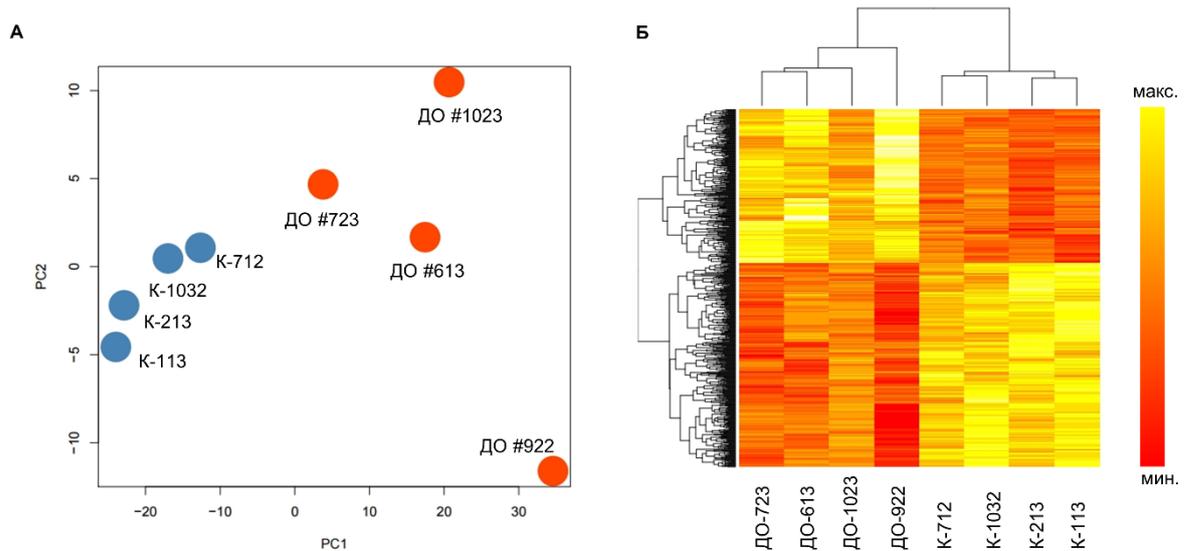


Рисунок 11. А. Кластеризация экспериментальных образцов с использованием анализа вариации методом главных компонент. Оси соответствуют расстояниям по первой и второй компоненте, соответственно. Красный цвет - животные ДО группы, синий – контрольные животные. **Б.** Тепловая карта, иллюстрирующая различия в уровне экспрессии генов между группами по 500 наиболее изменившимся генов.

Анализ обогащения ДЭ генов по терминам генной онтологии (Gene Ontology) выявил большее 200 обогащенных категорий по биологическим процессам (Biological process), 39 по молекулярным функциям (Molecular function) и 135 по клеточным компонентам (Cellular process). В частности, среди ДЭ генов в ДО группе по биологическим процессам выявлено обогащение по терминам Gene Ontology (GO:0007399, nervous system development, $2.69e-8$; GO:0007272 ensheathment of neurons, $5.59e-7$; GO:0048666, neuron development, $1.18e-5$ и GO:0031175 neuron projection development, $2.59e-5$). Мы обнаружили изменения в экспрессии генов, связанных с формированием миелиновой оболочки (*Mbp*, *Plp1*, *Ugt8a*), экспрессия этих генов была увеличена в группе ДО. Помимо этих генов была изменена экспрессия других генов, связанных с ключевыми процессами развития нервной системы, такими как гены транскрипционных факторов (*Arx*, *Foxp2*), гены нейротрофического фактора мозга (*Bdnf*). Среди ДЭ генов по молекулярным функциям белковых продуктов генов было найдены обогащения в таких категориях по терминам Gene ontology как (GO:0019911,

structural constituent of myelin sheath; GO:0005251, delayed rectifier potassium channel activity, 0.003; GO:0005261, cation channel activity; GO:0015318, inorganic molecular entity transmembrane transporter activity; GO:000832, cation transmembrane transporter activity; GO:0005249, voltage-gated potassium channel activity; GO:0005231, excitatory extracellular ligand-gated ion channel activity), что свидетельствует об изменении экспрессии генов, связанных с формированием миелиновой оболочки, а также синаптической потенциации. Оба этих процесса составляют основу синаптической и нейрональной пластичности. Среди ДЭ генов по клеточным компонентам белковых были найдены обогащения в (GO:0097458, neuron part; GO:0045202, synapse, GO:0043005 neuron projection GO:0030424 axon), а также (GO:0043209, myelin sheath), что также подтверждает общую концепцию о том, что ранний постнатальный стресс оказывает влияние на гены, связанные с процессами миелинизации. Мы также обнаружили, что среди дифференциально экспрессирующихся генов ($p_{adj} < 0.1$) в группе ДО значительно представлены гены, кодирующие белки малой и большой субъединицы рибосом, при этом экспрессия данных генов повышена по сравнению с контролем. Кроме того, мы выявили снижение экспрессии генов, кодирующих субъединицы NMDA глутаматных рецепторов (*Grin2a*, *Grin2b*), а также гена *Homer1* связанных с проявлением высших когнитивных функций.

Для подтверждения изменений в экспрессии некоторых ключевых генов, на расширенных выборках животных был проведен количественный ПЦР анализ. Была проанализирована экспрессия генов, связанных с процессами миелинизации (*Enpp6*, *Plp1*, *Mobp1*, *Ugt8a*, *Mog*, *Mbp*, *Mag*, *Cnp*, *Opalin*), глутаматергической и ГАМКергической систем (*Gad1*, *Gabr1b*, *Slc6a11*, *Slc32a1*, *Grin2a*, *Grin2b*) и другие ключевые гены, связанные с синаптической пластичностью (*Pclo*, *Robo3*) (Рис. 12). Интересно, что лишь экспрессия 2 генов была снижена по данным ПЦР между ДО и контрольной группой: *Pclo* [$t(25)=2.98$, $p=0.006$] и *Gabr1b* [$t(25)=3.05$, $p=0.005$]. *Pclo* кодирует белок,

который является частью пресинаптического матрикса цитоскелета, он участвует в создании активных синаптических зон и транспортировке синаптических пузырьков. *Gabr1b* кодирует рецептор гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), который является основным тормозным нейротрансмиттером в центральной нервной системе. Снижение экспрессии этих генов по всей видимости оказывает влияние на синаптическую пластичность. Экспрессия еще 3-х генов имела тенденцию к повышению в группе ДО по сравнению с контролем: *Slc6a11*, кодирующий транспортер обратного захвата ГАМК из синаптического пространства, *Slc32a1*, кодирующий транспортер ГАМК, обеспечивающий высвобождение ГАМК в синаптическое пространство и *Ugt8a*, кодирующий фермент гликозилтрансферазу, участвующую в синтезе сфинголипидов, входящих в состав миелиновых мембран. Несмотря на то, что направление экспрессии всех генов по данным ПЦР и транскриптомного анализа совпадало, незначительные изменения по данным ПЦР среди ДЭ генов на расширенных выборках животных свидетельствуют о том, что, по всей видимости, группа ДО гетерогенна и не все животные с историей стресса в ранний постнатальный период демонстрируют схожие молекулярные изменения.

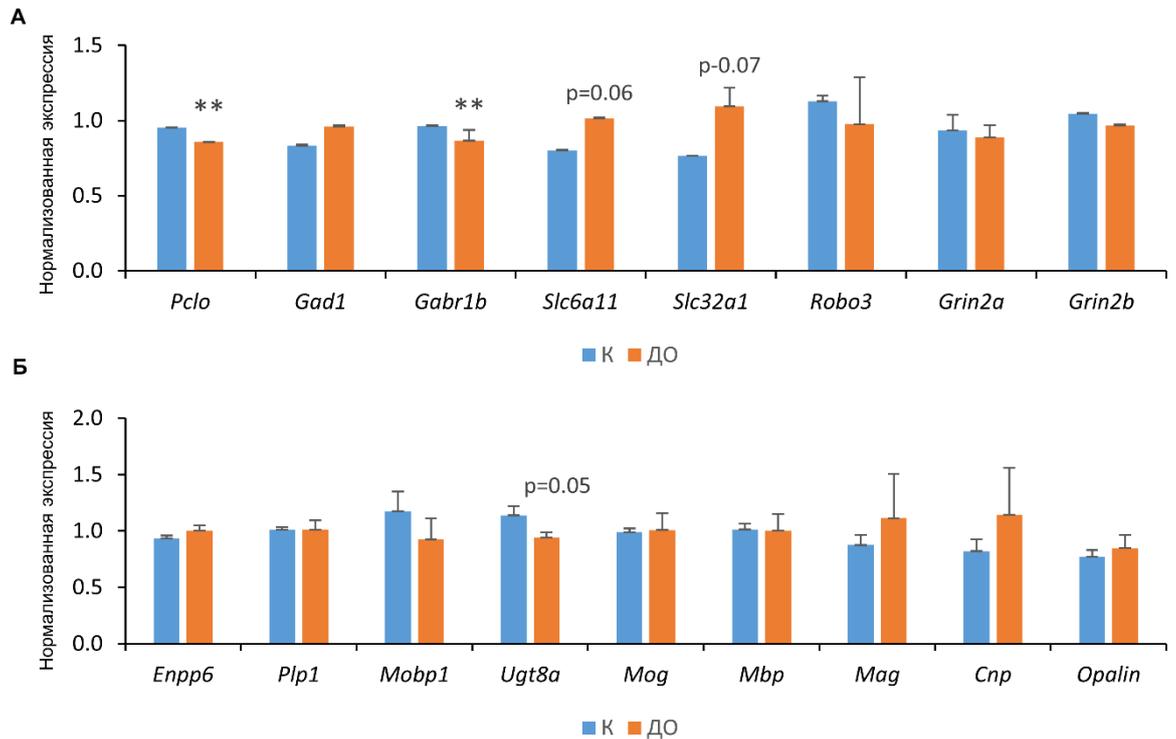


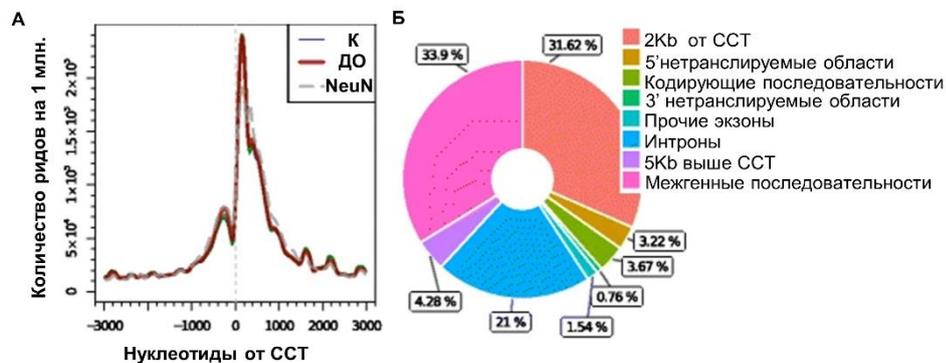
Рисунок 12. Отставленные во времени эффекты длительного отделения в ранний постнатальный период на экспрессию генов в префронтальной коре взрослых самцов мышей с помощью метода ПЦР. **А.** Экспрессия генов глутаматергической, ГАМК-эргической систем и других генов синаптической пластичности **Б.** Экспрессия генов, связанных с процессами миелинизации. Данные по экспрессии генов были оценены как ΔCt , в качестве генов домашнего хозяйства были использованы гены *Pik3c3* и *Rabb22a*. Данные по каждой группе были нормализованы на среднее значение по контрольной группе (средние значения контрольной группы приняты за 1). Данные представлены как нормализованные значения \pm ошибка среднего; ** $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой. По 11-15 животных в каждой группе.

3.7. Влияние раннего постнатального стресса на распределения метки активного хроматина H3K4me3 во префронтальной коре с помощью метода ChIP-seq

Чтобы оценить, имеют ли взрослые с историей стресса в ранний постнатальный период какие-либо долгосрочные изменения в профиле H3K4me3 в префронтальной коре, мы провели нативный анализ ChIP-seq, с использованием микрококковой нуклеазы (MNase). Этот подход дает профили гистонов с гораздо лучшим соотношением сигнал-шум по

сравнению с протоколами, использующими фиксацию формальдегидом (Huang et al., 2006). В среднем было получено около 9,8 млн. парных прочтений (9,5-10,2 млн.) на каждую библиотеку, количество картированных на геном мыши прочтений превышало 94% в каждом образце, а количество дубликатов не превышало 16%. Все библиотеки демонстрировали высокие значения обогащения и соответствовали оценкам качества библиотек, рекомендованным консорциумом ENCODE (Landt et al., 2012)(Приложение 2).

Идентифицированные пики H3K4me3 располагались преимущественно в промоторных областях генов и образовывали типичную форму вокруг сайтов старта транскрипции (Рис. 13), полностью напоминающую геномное распределение, описанное ранее (Feng et al., 2014). В качестве входящего распределения пиков (input) мы использовали общедоступные данные, полученных на нейронах префронтальной коры мыши. Хотя использование такого входного контроля может повлиять на пороги обнаружения пиков, оно не должно оказывать заметного влияния на сравнительный анализ



дифференциального обогащения обнаруженных пиков. Учитывая, что данные совпали со всеми известными характеристиками метки H3K4me3, мы сочли использование ранее полученных координат пиков приемлемым для сравнительного исследования.

Рисунок 13. Геномное распределение пиков H3K4me3, обнаруженных в префронтальной коре. **А.** Распределение H3K4me3 вокруг сайта старта транскрипции - ССТ. Представлены данные по контрольной группе (К),

группе длительного отделения (ДО) и внешние данные о распределении H3K4me3 в NeuN-положительных нейронах префронтальной коры (SRR5032626). **Б.** Распределение пиков по разным районам генома.

Для анализа дифференциального обогащения профилей H3K4me3 мы использовали подход на основе MACS-DESeq2. Этот подход позволил идентифицировать небольшое подмножество умеренно измененных широких пиков в группе ДО. Было обнаружено, что 45 областей модификации H3K4me3 увеличены, затрагивая в общей сложности промоторы 70 генов. Значительная часть дифференциальных пиков H3K4me3 (42%) была обнаружена внутри двунаправленных промоторов.

Следует отметить, что наблюдаемые изменения дифференциально обогащенных модификацией активного хроматина H3K4me3 областей умерены ($|\log FC| < 1.5$). Мы проанализировали, имеют ли гены, с измененными пиками H3K4me3 в их промоторах, какие-либо общие функциональные особенности. Реконструкция генной сети с помощью базы данных STRING (<https://string-db.org/>) и анализ обогащения в терминах генной онтологии (Gene Ontology) позволили объединить ряд генов в определенные, хотя и несколько общие, функциональные группы (Рис. 14). Среди обогащенных категорий были гены, вовлеченные в процессы регуляции экспрессии (GO:0010468, $_{adj}P = 0,0435$). В эту категорию попали гены, связанные с модуляцией структуры хроматина (*Ash1l*, *Supt6*, *Cir1*, *Phf12* и др.), факторы транскрипции (*Klf6*, *Hlf*), среди которых несколько генов (*Zfp608*, *Zfp553*, *Zfp46*, *Zcchc9*) кодируют белки по типу цинковых пальцев и др. Среди других обогащенных категорий были гены, участвующие в процессинге мРНК (GO:0006397, $_{adj}P = 0,0456$) – сплайсинге (*Prpf40a*, *Rbm5*) и деградации (*Cnot6*). Другая группа генов с повышенным уровнем триметилированного H3K4 в промоторах относится к цитоскелету (GO:0005856, $_{adj}P = 0,0130$). Среди них следует отметить гены, отвечающие за подвижность синаптических везикул (*Dync1h1*) и формирование дендритных шипиков (*Wasl*) в нейронах.

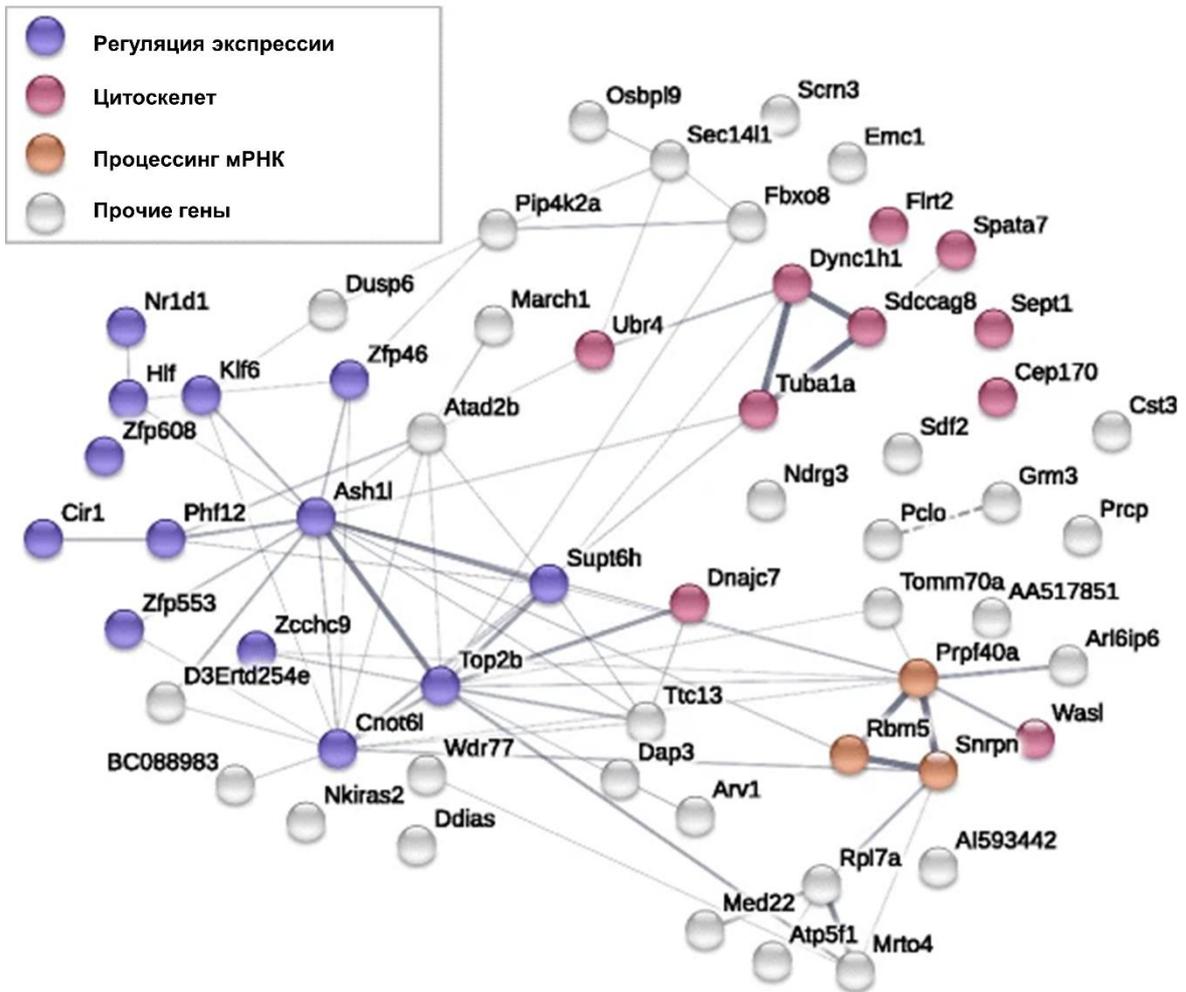


Рисунок 14. Сеть взаимодействий STRING между генами, дифференциально обогащенными H3K4me3 в группе длительного отделения. Цвет узлов представляет собой разные обогащенные категории в терминах GO.

Таким образом, результаты анализа свидетельствуют о том, что измененные профили H3K4me3 в ДО группы мышей носят неслучайный характер. Анализ обогащенных категорий свидетельствует о том, что последствия раннего постнатального стресса фиксируются в эпигенетических изменениях в промоторах генов, которые так или иначе регулируют экспрессию генов.

Сопоставление 649 ДЭ генов, полученных на основе анализа транскриптома и 70 генов с измененными профилями H3K4me3 показало,

что только 4 гена (*Tuba1a*, *Pclo*, *Rbm5*, *Cst3*) пересекаются между двумя этими списками генов. Интересно, что экспрессия 2 генов (*Tuba1a* и *Cst3*) была увеличена в группе ДО, так же как и профиль H3K4me3 в их промоторном регионе. В то же время экспрессия *Pclo*, *Rbm5* была снижена в группе ДО, тогда как профиль H3K4me3 в их промоторном регионе увеличен (Рис 15).

Tuba1a кодирует α -тубулин, который играет ключевую роль в формировании микротрубочек аксонов и развитии нейронов (Aiken et al., 2017). *Cst3* кодирует секретируемый белок массой 14 кДа цистатин С, который является ингибитором цистеиновых протеаз и ингибирует семейство лизосомальных протеаз (Deng et al., 2001). *Cst3* выполняет нейропротекторную функцию и участвует в восстановлении нервной системы при нейротоксических состояниях и нейродегенерации (Perez-Gonzalez et al., 2019). Изменения экспрессии и секреции *Cst3* в головном мозге наблюдались на моделях болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваниях (Gauthier et al., 2011; Korolenko, 2020).

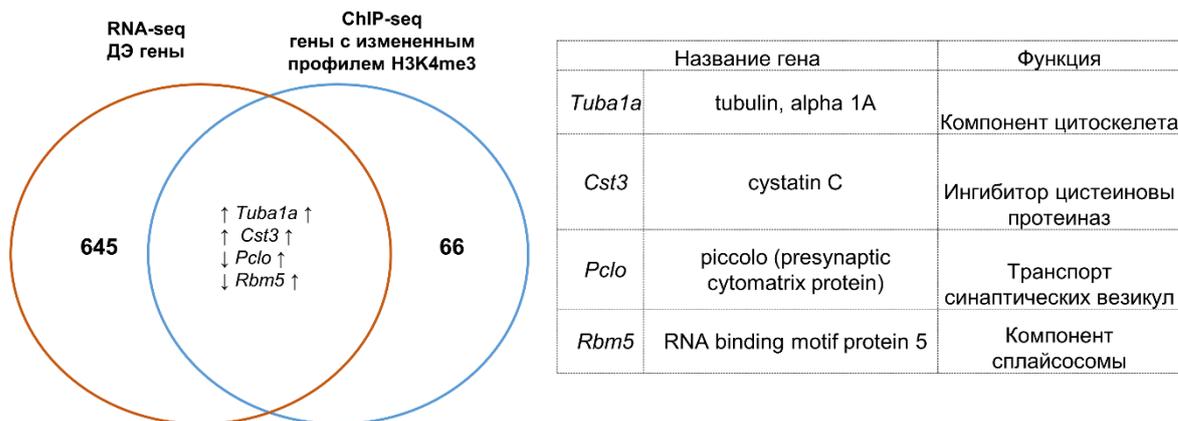


Рисунок 15. Сопоставление данных ChIP-seq и RNA-seq на префронтальной коре головного мозга.

Поскольку транскриптомные данные были получены в предыдущем эксперименте на другой группе мышей, мы решили проверить как изменение профиля H3K4me3 в промоторных регионах генов влияет на их уровень

экспрессии в рамках одного эксперимента. Мы выбрали 11 из 70 генов, демонстрирующих значительные изменения обогащения H3K4me3 в своих промоторах, и оценили изменение их экспрессии с помощью ПЦР в режиме реального времени (Рис. 16). Было обнаружено, что стресс в раннем возрасте приводит к усилению экспрессии только трех генов по сравнению с контролем - *Ddias* (супрессор апоптоза, индуцированный повреждением ДНК) ($p=0,006$), *Pip4k2a* (фосфатидилинозитол-5-фосфат-4-киназа, тип II, альфа) ($p=0,019$) и регулируемый N-Мус ген *Ndr3* ($p=0,035$). Экспрессия остальных 8 генов не отличалась между группами. Таким образом, уровни экспрессии большинства генов оставались неизменными, в тоже время экспрессия *Ndr3*, *Pip4k2a* и *Ddias* была выше в группе ДО, что хорошо согласуется с увеличением плотности распределения H3K4me3 в их промоторном регионе.

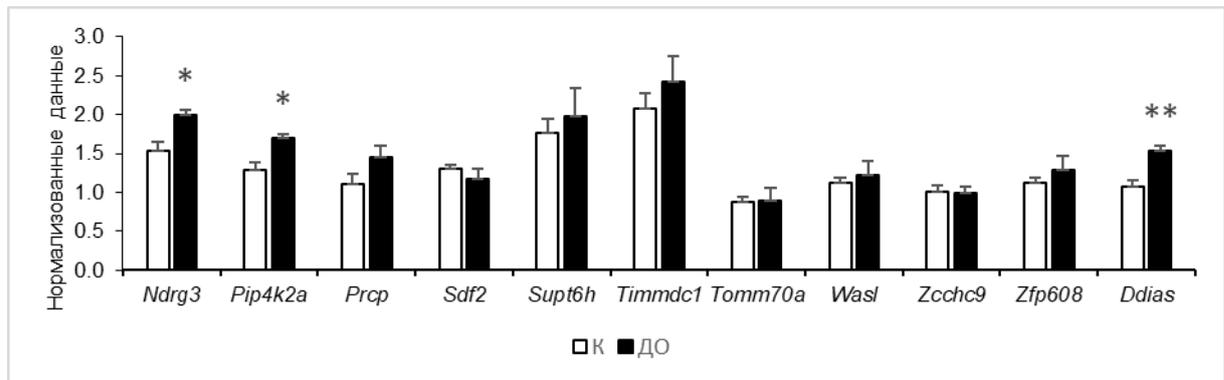


Рисунок 16. Относительный уровень экспрессии генов, в промоторе которых было найдено изменение профиля H3K4me3. Данные по экспрессии генов были оценены как ΔCt , в качестве генов домашнего хозяйства были использованы гены *Hprt* и *Rps16*. Данные по каждой группе были нормализованы на среднее значение по контрольной группе (средние значения контрольной группы приняты за 1). Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего; К – контроль, ДО – группа с длительным отделением в детстве. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ в сравнении с контрольной группой. В группах было по 6-10 животных.

3.8. Влияние раннего постнатального стресса на чувствительность к стрессу во взрослом возрасте

У взрослых мышей с историей раннего постнатального стресса была оценена устойчивость к дополнительным стрессовым воздействиям во взрослом возрасте. Мыши были подвергнуты хроническому стрессу социальных поражений. Стресс оказал значимое влияние на уровень кортикостерона мышей [$F(2, 24) = 7.88, p = 0.003$]. Мыши ДО+СС группы демонстрировали повышенный уровень кортикостерона как по сравнению с контрольной группой ($p < 0.001$), так и по сравнению с мышами СС группы ($p = 0.043$, Рис. 17А). В дальнейшем для выбора животных для последующего молекулярного анализа, животные были кластеризованы на основе данных по уровню кортикостерона в надпочечниках, время, проведенного в закрытых рукавах, в тесте приподнятого крестообразного лабиринта и время, проведенного в контакте с партнером, в тесте социального взаимодействия. Были отобраны по 3-4 животных из каждой группы для последующего анализа транскриптома и профиля НЗк4ме3.

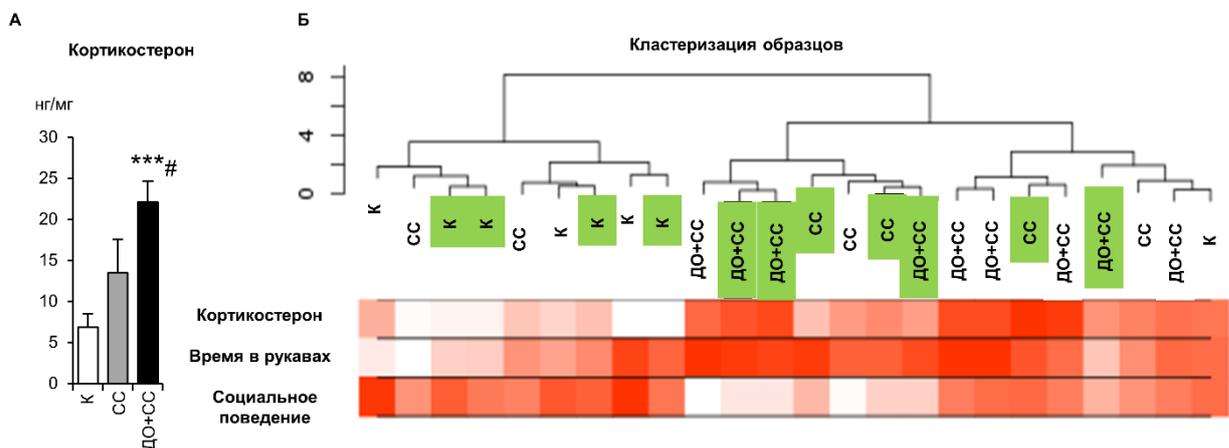


Рисунок 17. Влияние стресса в ранний постнатальный период на чувствительность к стрессу социальных поражений во взрослом возрасте. **А.** Уровень кортикостерона в надпочечниках у контрольной группы (К), группы подверженной только хроническому стрессу социальных поражений (СС) и группы с сочетанием стрессов (ДО+СС). Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего; *** – $p < 0.01$ в сравнении с контрольной группой; # – $p < 0.05$ в сравнении с СС группой. По 8 животных в группе. **Б.** Кластеризация образцов на основе данных по концентрации кортикостерона

в надпочечниках, времени, проведенного в закрытых рукавах, в тесте приподнятого крестообразного лабиринта и времени, проведенного в контакте с партнером, в тесте социального взаимодействия. Зеленым выделены образцы, которые были использованы в дальнейшем для ChIP-seq и RNA-seq анализа.

3.8.1. Транскриптомные изменения после воздействия стресса социальных поражений

Высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina 4000 позволило получить в среднем ~43 миллиона (38–47 миллионов) парных прочтений на каждый образец. Качество данных секвенирования оценивали с использованием программного обеспечения FastQC и Picard CollectRnaSeqMetrics. Все библиотеки были хорошего качества, количество рибосомальных ридов не превышало 0.5%, более 95% ридов в каждой библиотеке уникально картировались на геном мыши (Приложение 3). Было идентифицировано 14 901 генов с количеством прочтений фрагментов (counts) в каждом образце не менее чем 10.

Анализ данных показал изменения экспрессии генов под влиянием хронического стресса социальных поражений как в группе СС, так и в группе ДО+СС. В группе СС экспрессия 11 генов была изменена по сравнению с контрольными животными (10 с повышенной экспрессией и один с пониженной экспрессией), тогда как в группе ДО+СС была изменена экспрессия 20 генов по сравнению с контролем (10 с повышенной и 10 с пониженной экспрессией) (Рис. 18). Экспрессия только одного гена (*Stim2*) была снижена как в СС, так и в ДО+СС группе. Группы СС и ДО+СС не имели достоверных ДЭ генов между собой, что, возможно, свидетельствует о более выраженном влиянии недавнего стресса социальных поражений на экспрессию генов по сравнению с отсроченными эффектами стресса в раннем возрасте. Анализ обнаруженных ДЭ генов не показал обогащения какими-либо категориями GO.

Мы попытались оценить, как изменения в экспрессии генов, связанных с ДО, влияют на экспрессию генов, участвующих в ответе на СС. С этой целью

мы использовали данные транскриптома после ДО. Мы сравнили направления изменений экспрессии среди трех групп (только ДО, СС и ДО+СС, Рис. 18). Анализируя гены, экспрессия которых изменялась при социальном стрессе в группе СС, мы видим, что для большинства ДЭ генов в СС группе (8 из 11, 72%) их направление изменения в ДО группе было в противоположном направлении. Можно предположить, что незначительное подавление этих генов у животных с ранним постнатальным стрессом вызывает менее выраженное увеличение их экспрессии в ответ на стресс социальных поражений, тем самым ослабляя влияние стресса на экспрессию этих генов.

Обратная картина изменений наблюдается по генам, экспрессия которых достоверно менялась в группе ДО+СС. В большинстве случаев изменения экспрессии во всех трех группах имели одинаковую направленность, а достоверные различия экспрессии в группе ДО+СС по сравнению с контролем могут быть обусловлены суммированием эффектов раннего постнатального и социального стресса. Возможно, именно процессы, в которых участвуют эти гены, провоцируют повышенную чувствительность к стрессу под влиянием ДО. Особенно это касается генов, изменения экспрессии которых в группе ДО были значимыми ($p_{\text{adj}} < 0,05$ для *Homer1*; $p < 0,05$ для *Smoc1*, *Ptk2*, *Pdp1*, *Enc1*, *Sorcs3* и *Stim2*). Наиболее интересный результат был получен по гену *Homer1*. Анализ профиля его вариантов сплайсинга позволяет предположить, что группа ДО+СС характеризуется более низкой экспрессией *Homer1* из-за специфического подавления транскрипта *Homer1a*.

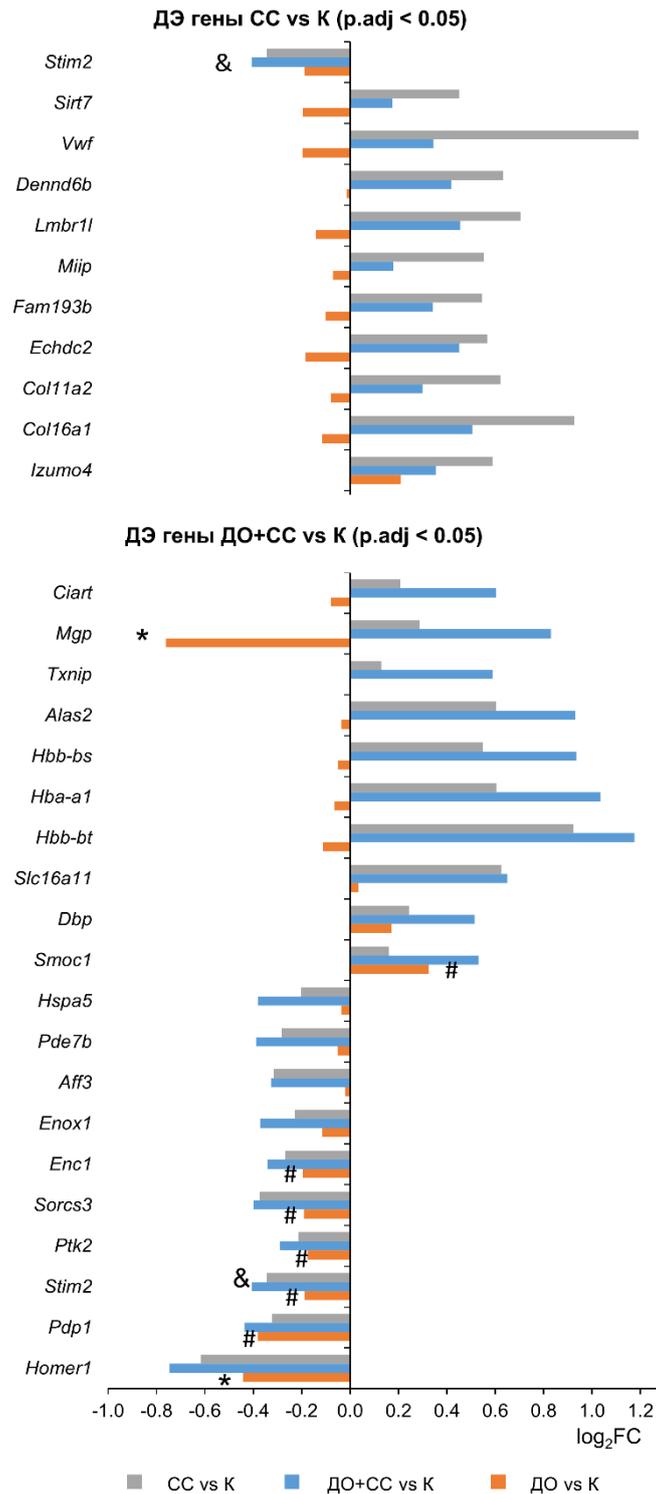


Рисунок 18. Относительные изменения экспрессии генов (\log_2FC), вызванные стрессом в раннем возрасте (ДО), стрессом социального поражения (СС) и их комбинацией (ДО+СС). Изменения экспрессии генов в разных группах среди ДЭ генов мышей СС (вверху) или мышей ДО+СС (внизу). & $p_{\text{adj}} < 0,05$ по сравнению с контрольной группой NS (*Stim2* был дифференциально экспрессирован как в группе СС, так и в группе ДО+СС); * $p_{\text{adj}} < 0,05$, # $p_{\text{val}} < 0,05$ по сравнению с контролем.

Ограниченное число ДЭ генов с порогом ($p_{\text{adj}} < 0,05$) не позволило нам найти обогащенных категорий в терминах GO. Для более полной оценки молекулярных изменений после социального стресса мы провели анализ ДЭ генов с более мягким порогом ($p_{\text{val}} < 0,05$ с $FC > 1,3$). Такой подход позволил выявить 293 ДЭ гена в группе ДО+СС и 327 ДЭ гена в группе СС по сравнению с контрольными животными, причем 107 генов были ДЭ как в группе СС, так и в группе ДО+СС. При сравнении групп ДО+СС и СС обнаружено 100 ДЭ генов.

Для анализа обогащений ДЭ генов ($p_{\text{val}} < 0,05$ с $FC > 1,3$) в терминах GO использовалась база данных WebGestalt (<http://www.webgestalt.org/>). При анализе ДЭ генов СС группы было найдено 20 обогащенных категорий ($FDR < 0,05$) среди биологических процессов, две среди клеточных компонентов и одна среди молекулярных функций. При анализе обогащенных категорий ДЭ генов ДО+СС было также найдено 20 обогащенных категорий ($FDR < 0,05$) среди биологических процессов, две среди клеточных компонентов и две среди молекулярных функций. При анализе обогащенных категорий ДЭ генов между СС и ДО+СС группами было обнаружено 7 обогащенных категорий в терминах GO.

Сравнение категорий GO, которыми были обогащены ДЭ гены как в группе ДО + СС, так и в группе СС, выявило общие категории GO, связанные с внеклеточным матриксом и адгезией (GO: 0043062: организация внеклеточной структуры, GO: 0005581: тримеризация коллагена, GO:0031012: внеклеточный матрикс), а также категории GO, относящиеся к развитию сенсорной системы (GO:0090596: морфогенез органов чувств, GO:0048568: развитие эмбриональных органов и GO:0043583: развитие уха). Интересно, что анализ обогащенных категорий ДЭ генов между СС и ДО+СС группами также показал обогащение в категориях, связанных с внеклеточным матриксом и адгезией (Рис. 19Г).

Анализ дифференциально альтернативно сплайсированных генов ($p_{\text{adj}} < 0,05$) выявил дифференциальное альтернативное использование экзонов транскриптов генов *Homer1* и *Vps33a* в группе ДО+СС и для *Fnbp1l* в группе СС. Функциональный анализ транскриптов показал, что в группе ДО+СС наблюдается снижение экспрессии короткого варианта мРНК (ENSMUST00000102752.9), кодирующего изоформу *Homer1a*, которая участвует в регуляции передачи глутамата и защищает от NMDA-индуцированного повреждения нейронов (Wang et al., 2015a). Найденные нами дифференциальные события альтернативного сплайсинга в генах *Vps33a* и *Fnbp1l* не встречаются в литературе и вероятно не имеет важного функционального значения. Мы не обнаружили дифференциально-альтернативно сплайсированных генов при сравнении групп СС и ДО+СС.

Для проверки данных RNA-seq был проведен количественный ПЦР анализ отдельных ДЭ генов на расширенном числе образцов ($n = 7-9$ на группу). С помощью ПЦР анализа была оценена экспрессия генов *Mgp*, *Ciart*, *Dbp* и *Stim2*, экспрессия которых изменялась только в группе ДО+СС, а также два основных транскрипта (*Homer1a* и *Homer1bc*) гена *Homer1*, соотношение которых изменялось в этой группе по результатам анализа альтернативного сплайсинга. В соответствии с транскриптомными данными, результаты ПЦР также показали изменение экспрессии генов *Mgp*, *Ciart* и *Dbp* [$F(2,21) = 4,14$, $p = 0,0321$; $F(2,21) = 4,26$, $p = 0,0316$; и $F(2,21) = 3,91$, $p = 0,044$ соответственно] и транскрипта *Homer1a* [$F(2,21) = 4,50$, $p = 0,0251$], а также соотношение мРНК *Homer1a/Homer1bc* [$F(2,21) = 4,50$, $p = 0,0251$, рис. 2b]. Мы выявили лишь незначительное влияние стресса на экспрессию *Stim2* [$F(2,21) = 2,82$, $p = 0,093$], но направление изменений экспрессии соответствовало результатам транскриптомного анализа. Результаты ПЦР подтвердили, что экспрессия генов *Mgp*, *Ciart* и *Dbp* была выше в группе ДО+СС ($p < 0,05$). В соответствии с данными транскриптомного анализа как группа ДО+СС, так и группа СС также показали снижение соотношения

уровней мРНК Homer1a/Homer1bc ($p < 0,05$). Тем не менее, значительное снижение уровня экспрессии транскрипта Homer1a было отмечено только в группе MS + SDS ($p < 0,01$, Рис. 19Б). Таким образом, наши результаты транскриптомного и ПЦР-анализа подтвердили, что экспрессия некоторых генов, связанных с регуляцией циркадных ритмов и синаптической пластичностью, специфически менялась только в группе с двумя стрессовыми воздействиями (ДО+СС).

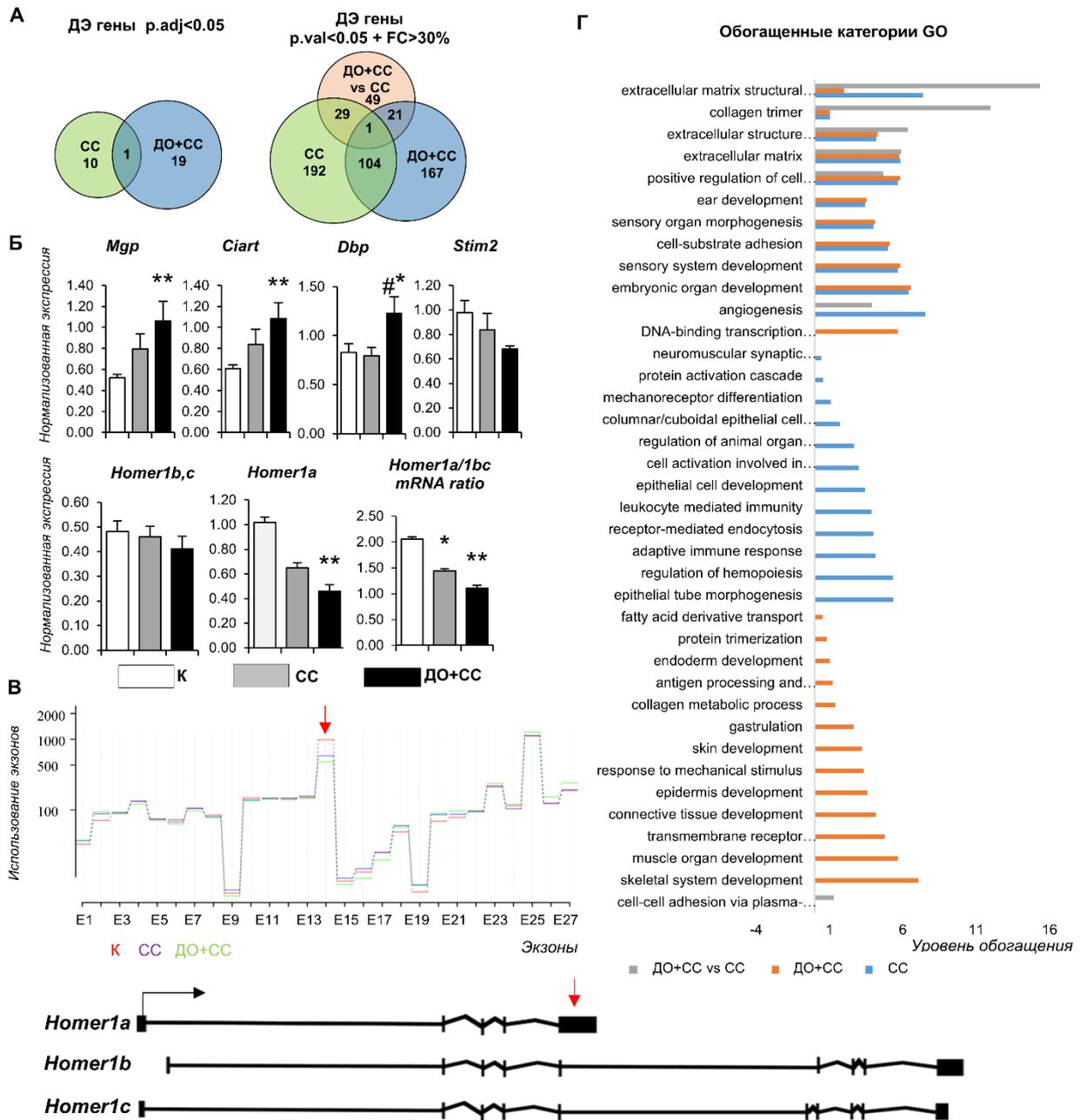


Рисунок 19. Влияние стресса социальных поражений на экспрессию генов. **А.** Диаграммы Венна для ДЭ генов с порогом ($p_{adj} < 0,05$) и ДЭ генов с порогом ($p < 0,05$ и $FC > 30\%$). **Б.** Результаты количественного ПЦР-анализа генов *Mgp*, *Ciart*, *Dbp* и *Stim2* и транскриптов *Homer1*. Данные по экспрессии генов были оценены как ΔCt , в качестве гена домашнего хозяйства был использован ген *Actb*. Данные по каждой группе были нормализованы на среднее значение по контрольной группе. Данные представлены как нормализованные значения \pm ошибка среднего. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; # $p < 0,05$ по сравнению с группой СС. По 7-8 животных в группе. **В.** Схематическое представление представленности

экзонов Homer1 в различных группах на основе анализа DEXSeq. По оси абсцисс показаны названия фрагментов экзонов, а по оси ординат – среднее нормализованное количество каждого фрагмента по группе. Красная стрелка указывает на фрагмент экзона (расположенный в 5-м экзоне), который дифференциально представлен в разных группах. Г. Анализ обогащения ДЭ генов в разных группах в категориях GO.

3.8.2. Влияние стресса социальных поражений на профиль H3K4me3

Анализ данных ChIP-seq показал, что все библиотеки были секвенированы с достаточным покрытием и показали высокие уровни обогащения, а также соответствовали всем другим критериям качества, рекомендованным консорциумом ENCODE (Landt et al., 2012). Пики H3K4me3 располагались преимущественно в промоторных областях генов и формируют типичный паттерн вокруг сайта старта транскрипции (Приложение 4). Использование микрококковой нуклеазы во время этапа пробоподготовки позволило нам в дополнение к широким пикам H3K4me3 идентифицировать нуклеосомные пики.

Распределение H3K4me3 в префронтальной коре показало относительно низкую вариабельность во всех образцах. Мы идентифицировали 14 661 широких пиков и 87 490 нуклеосомных пиков, расположенных в промоторных областях аннотированных генов. Анализ дифференциальных профилей H3K4me3 с порогом ($p_{\text{adj}} < 0,05$) не выявил различий в величине триметилирования H3K4 в группе СС по сравнению с контролем или в группе ДО+СС по сравнению с группой СС. Мы обнаружили различия в уровнях H3K4me3 в двух широких пиках и одном нуклеосомном пике в группе ДО+СС по сравнению с контролем ($p_{\text{adj}} < 0,05$) в промоторных областях двух генов, *Vmn2r-ps18* и *Gm13142*, которые плохо аннотированы и функционально не связаны друг с другом.

Для дальнейшего анализа мы выбрали более мягкий порог для пиков с измененной плотностью H3K4me3 (значение $p < 0,05$, $FC > 1,3$) и ограничили положение пиков промоторной областью генов (± 1000 п.н. от сайта старта транскрипции), которые были обнаружены в нашем транскриптомном

анализе (14 901 ген). При применении этого порога 86 % генов, идентифицированных в RNA-seq имели метки H3K4me3 в своем промоторе, и среди них в 21 % генов уровень H3K4me3 изменялся под влиянием либо у СС группы, либо у ДО+СС группы. Большинство этих изменений затрагивало только несколько одиночных нуклеосомных пиков.

Между группами СС и К мы обнаружили различия в триметилировании H3K4 в 98 широких пиках и в 1832 одиночных нуклеосомных пиках, которые расположены в промоторах 1583 генов. Группа ДО+СС отличалась от контрольной группы по уровню H3K4me3 в 56 широких пиках и в 1895 нуклеосомными пиках, расположенными в промоторах 1676 генов. Анализ триметилирования H3K4 между группами ДО+СС и СС выявил 29 широких пиков и 71 нуклеосомный пик с измененной плотностью H3K4me3 в промоторных областях 602 генов.

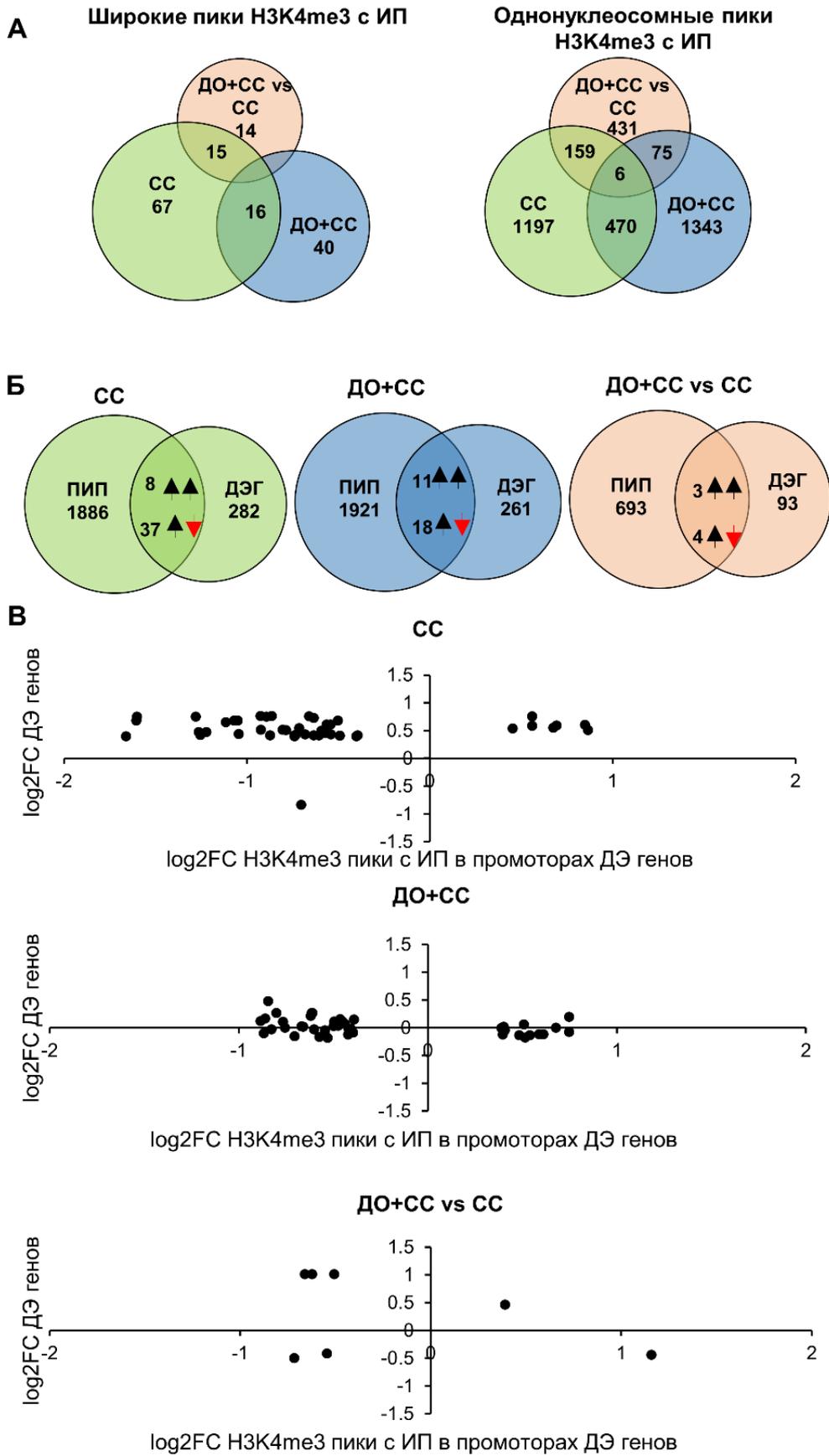


Рисунок 20. Анализ пиков H3K4me3 в промоторах экспрессирующихся генов. **А.** Диаграммы Венна широких и нуклеосомных пиков H3K4me3 с измененной плотностью (ИП). **Б.** Пересечение между ДЭ генами и генами, с

пиками с измененной плотностью H3K4me3 в их промоторах. Цифры возле стрелок указывают количество генов с одинаковым или противоположным направлением изменения экспрессии или изменения плотности пиков H3K4me3 в промоторе. **В.** Точковая диаграмма log2FC экспрессии генов (на основе данных RNA-seq) и с log2FC уровней H3K4me3 в соответствующих промоторах.

На следующем этапе работы мы провели анализ обогащения генов в терминах GO, промоторы которых содержали пики H3K4me3 с измененной плотностью распределения. Анализ генов группы СС выявил четыре обогащенных категории GO с FDR <0,1 (GO: 0001525: ангиогенез, GO: 0034341: ответ на гамма-интерферон, GO: 0097485: проекции нейронов и GO: 0048568: развитие эмбриональных органов), тогда как в группе ДО+СС был отмечен только одно обогащение в категориях GO (GO: 0097485: проекции нейронов). После этого мы провели анализ обогащения набора генов, промоторы которых содержали пики, профиль метилирования которых (H3K4me3) различался между группами социального поражения (ДО+СС vs СС). Результаты показали обогащение категориями GO (GO: 0060560: рост и развитие во время морфогенеза, и GO: 0097485: проекции нейронов).

Чтобы проанализировать влияние плотности распределения триметилирования H3K4 на экспрессию генов, мы определили, какие ДЭ гены демонстрируют измененную плотность распределения H3K4me3 в своих промоторах. Мы обнаружили, что 29 из 293 ДЭ генов в группе ДО+СС, 45 из 327 ДЭ генов в группе СС и семь из 100 ДЭ генов при сравнении групп ДО+СС vs СС. Неожиданно только в ~25% случаев (22 из 81 ДЭ генов с измененной плотностью распределения H3K4me3) направление экспрессии генов совпадало с направлением изменений плотности H3K4me3 в их промоторах.

3.8.3. Взаимосвязь плотности распределения H3K4me3 в промоторе с экспрессией генов

Чтобы ответить на вопрос, как ландшафт H3K4me3 в промоторе связан с экспрессией соответствующего гена, мы проанализировали корреляцию между экспрессией генов и пиками H3K4me3 в их промоторах. Были проанализированы данные от 10 животных (все образцы, для которых были как данные RNA-seq и ChIP-seq, полученные на одном гомогенате префронтальной коры независимо от группы).

Анализ корреляции между широкими пиками H3K4me3 в промоторах генов, и экспрессией генов выявил отсутствие корреляции между этими двумя параметрами: $r^2=0,082$ (0,052–0,098, Рис. 24). Как и в случае с широкими пиками, анализ корреляции между одиночными нуклеосомными пиками H3K4me3 и экспрессией гена также показал низкую корреляцию: $r^2=0,031$ (0,052–0,098, Рис. 25). Коэффициенты корреляции как для широких, так и для нуклеосомных пиков H3K4me3, рассчитанные отдельно для каждого образца, имели нормальное распределение и не проявляли зависимости от предшествующего стрессового опыта [широкие пики: $F(2,9)=0,19$, $p=0,83$; однонуклеосомные пики: $F(2,9)=0,43$, $p=0,66$].

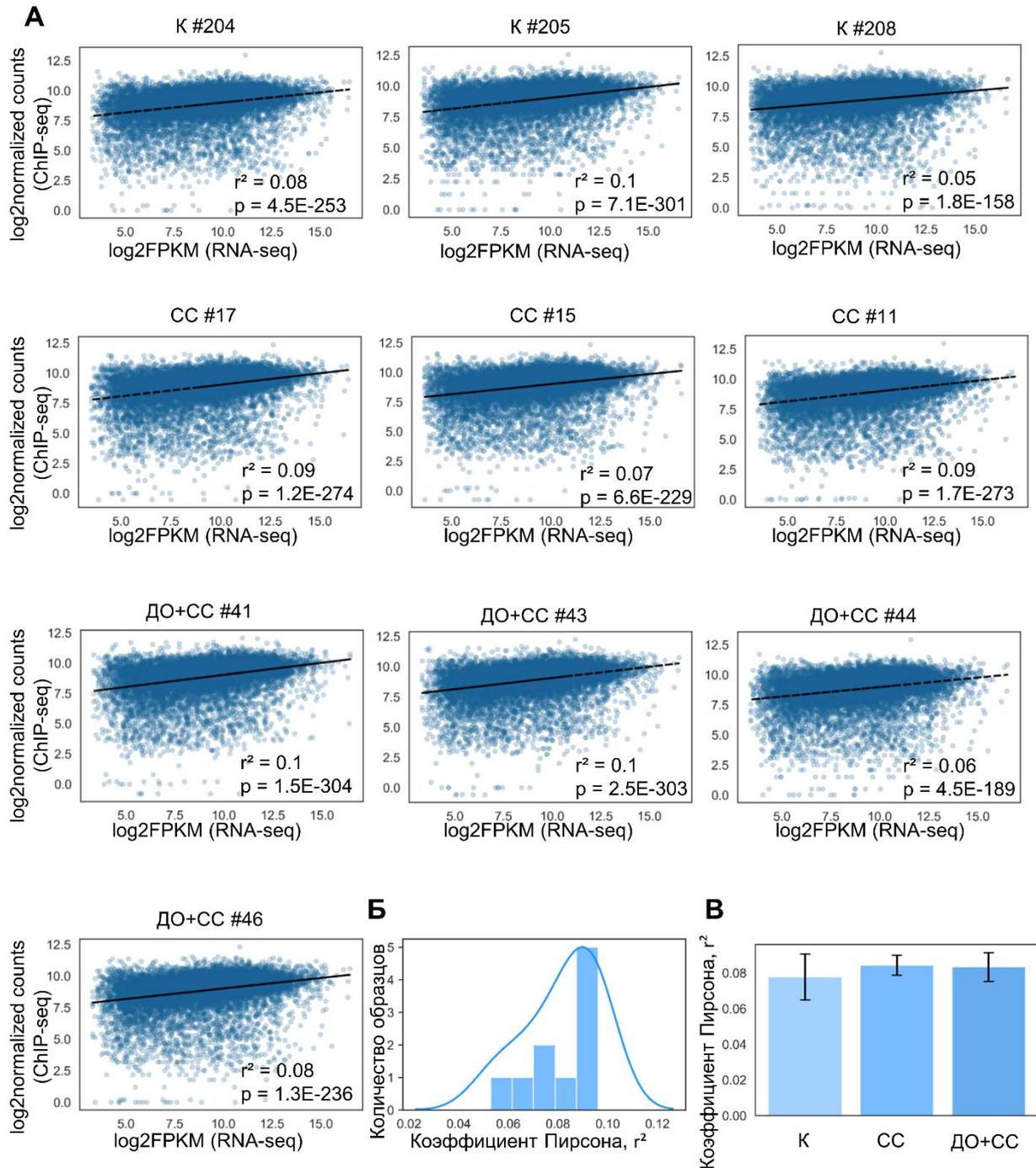
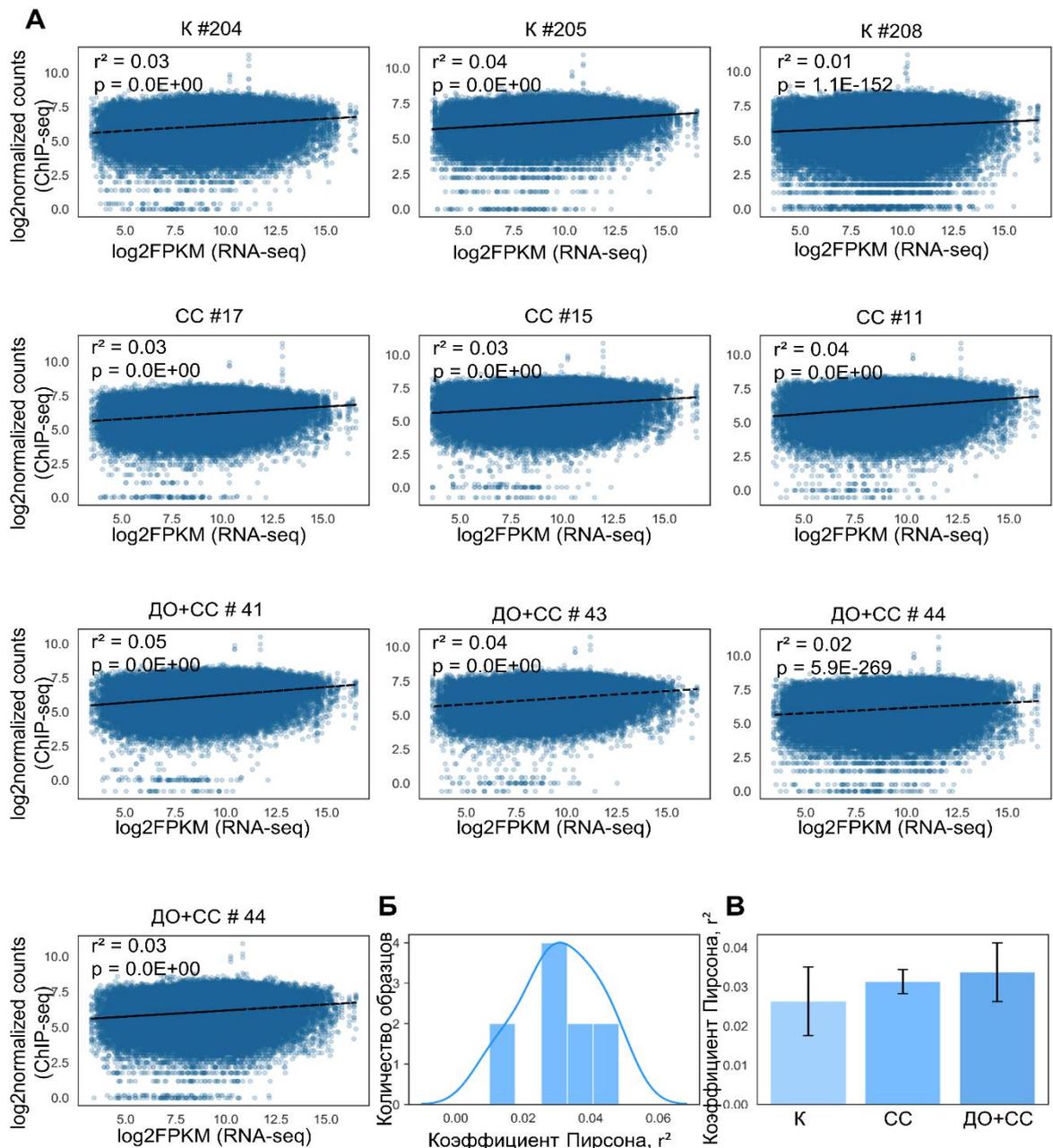


Рисунок 21. Корреляция между плотностью широких пиков НЗК4me3 в промоторах и экспрессией генов для каждого образца. А. Точковые диаграммы взаимосвязи между логарифмированным распределением НЗК4me3 в промоторных областях (ChIP-seq) и экспрессией генов (данные log2FPKM из анализа RNA-seq) для каждого образца. Б. Распределение значений (r^2) по всем образцам. В. Значение коэффициента корреляции Пирсона (r^2) по каждой экспериментальной группе. Данные представлены как

среднее \pm ошибка среднего. К - контрольная группа, СС - группы подвергнутая только хроническому стрессу социальных поражений и ДО+СС



- группы с сочетанием стрессов.

Рисунок 22. Корреляция между плотностью нуклеосомных пиков НЗК4me3 в промоторах и экспрессией генов для каждого образца. А. Точковые диаграммы взаимосвязи между логарифмированным распределением НЗК4me3 в промоторных областях (ChIP-seq) и экспрессией генов (данные log2FPKM из анализа RNA-seq) для каждого образца. Б.

Распределение значений (r^2) по всем образцам. В. Значение коэффициента корреляции Пирсона (r^2) по каждой экспериментальной группе. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего. К - контрольная группа, СС - группы подвергнутая только хроническому стрессу социальных поражений и ДО+СС - группы с сочетанием стрессов.

Наши результаты показали, что только 3528 одиночных нуклеосомных пиков (4,8%) и 688 широких пиков (5,1%) коррелируют с экспрессией генов. Более чем в половине случаев наблюдалась обратная корреляция между экспрессией гена и уровнями триметилированного НЗК4 в его промоторе. Таким образом, изменения уровня НЗК4me3 в промоторах генов в большинстве случаев не отражали изменений в экспрессии генов и наоборот.

Затем была проанализирована корреляция пиков НЗК4me3 среди генов, которые экспрессируются преимущественно в астроцитах, эндотелиальных клетках, микроглии, нейронах или олигодендроцитах. Списки 1000 наиболее специфичных генов для каждого клеточного типа были взяты из ранее опубликованных данных (McKenzie et al., 2018). Мы обнаружили значительную зависимость корреляции плотности распределения НЗК4me3 и экспрессии генов в зависимости от специфичности клеточной экспрессии [$F(5, 55)=41.43$, $p < 0.001$, Рис.23]. Коэффициенты корреляции (r^2) между широкими пиками НЗК4me3 в промоторах клеточно-специфичных генов не зависели от группы животных и варьировали от 0,073 до 0,189. Плотность НЗК4me3 более сильно коррелировала с экспрессией генов среди генов, специфичных для микроглии, по сравнению с другими генами, специфичными для клеток ($p < 0,05$). Экспрессия генов, специфичных для нейронов и эндотелиальных клеток, также более сильно коррелирует с плотностью НЗК4me3 по сравнению уровнем корреляции всех генов, ($r^2 = 0,126$ и $r^2 = 0.146$, $p < 0.001$). Эти результаты могут свидетельствовать о том, что в клетках различных типов модификация НЗК4me3 может оказывать различный вклад в регуляцию экспрессии отдельных генов.

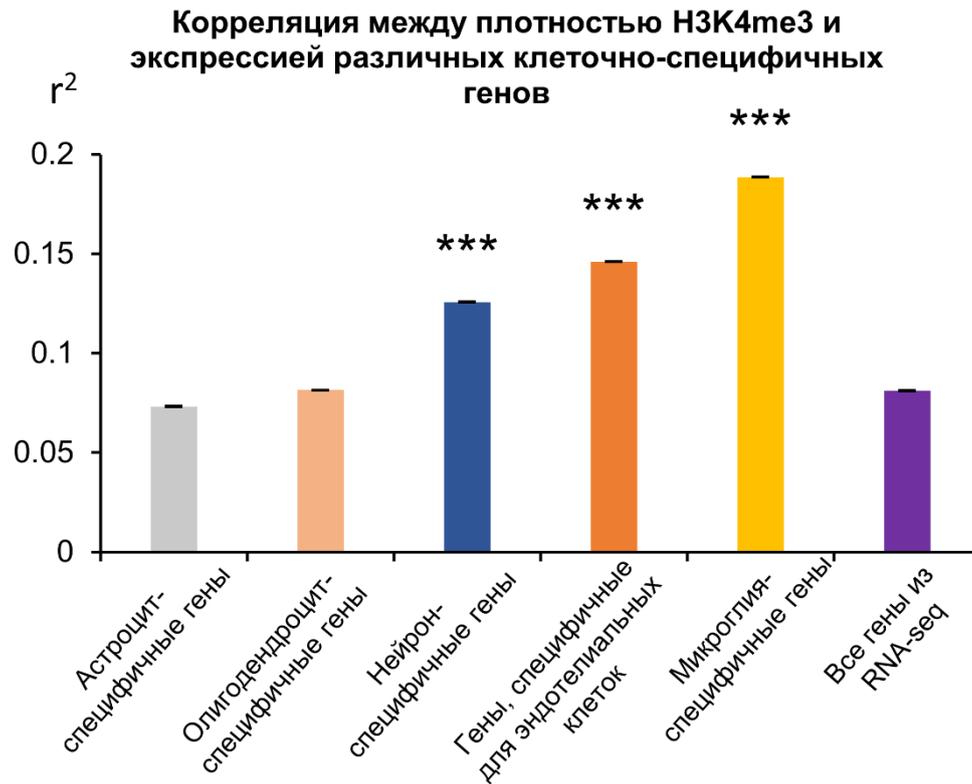


Рисунок 23. Корреляция между плотностью широких пиков H3K4me3 и экспрессией клеточно-специфических генов. Коэффициенты корреляции в разных типах клеточно-специфических генов (r^2). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. *** $p < 0.001$ по сравнению с коэффициентами корреляции со всеми генами из RNA-seq анализа.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе были проанализированы транскриптомные и эпигеномные (распределение модификации активного хроматина H3K4me3) изменения в префронтальной коре у взрослых животных с историей раннего постнатального стресса и после воздействия хронического стресса социальных поражений. Найденные нами поведенческие изменения в параметрах индивидуального, социального поведения, а также обучения и памяти позволили сопоставить молекулярные изменения с поведенческими. В совокупности эти данные позволили нам идентифицировать изменения экспрессии отдельных генов и генных сетей, также как изменения в распределении H3K4me3, вызванные отставленными во времени последствиями ДО от матерей в ранний постнатальный период. Кроме того, предъявление дополнительного стресса социальных поражений во взрослом возрасте позволило нам идентифицировать изменения экспрессии отдельных генов и генных сетей, также как изменения в распределении H3K4me3, связанные с чувствительностью к стрессу. Тем не менее, мы не нашли значимых изменений в базальном уровне активности ГГНС у детенышей на 15 постнатальный день, у мышей подросткового возраста (ПД40), так и у взрослых животных. Эти данные предполагают, что выявление эффектов раннего постнатального стресса требует применения высокоточных методов и иногда эти эффекты проявляются только при предъявлении дополнительных стрессовых воздействий, таких как хронический стресс социальных поражений.

4.1. Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период не влияет на базальную активность ГГНС у самцов мышей различных возрастов

В первые 2 недели жизни у детенышей грызунов наблюдается сниженная реакция коры надпочечников на умеренный стресс (известный как

стресс-гипореактивный период), и это явление опосредовано низким уровнем кортикостерона и АКТГ в крови. Такая нейроэндокринная адаптация, по-видимому, необходима для предотвращения сильного повышения уровня глюкокортикоидов, которые оказывают негативное влияние на рост и развитие головного мозга, подавляя формирование синаптических контактов и созревание олигодендроцитов, нейронов, микроглиальных и астроглиальных клеток (Sapolsky and Meaney, 1986b).

Мы не нашли значимого влияния раннего постнатального стресса на уровень кортикостерона в сыворотке крови, относительный вес надпочечников и экспрессию *Crh* в гипоталамусе у детенышей на ПД15, животных подросткового возраста на ПД40 и взрослых животных на ПД90. Данные литературы свидетельствуют о том, что отделение детенышей в течение суток провоцирует активацию ГГНС у детенышей в течение первых 8 часов разлучения, и эта активация, скорее всего, опосредована высвобождением КРФ. Тем не менее, после достижения пика активации повышенные уровни кортикостерона приводят к запуску отрицательной обратной связи активации ГГНС, тем самым стабилизируя ее активность через глюкокортикоидные рецепторы (Schmidt, 2010). К концу 24-часовой процедуры разлучения экспрессия *Crh* снижается в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса, а экспрессия *Nr3c1* и *Nr3c2* снижается в гиппокампе (Schmidt et al., 2004). Экспрессия *Crhr1* и *Crhr2* увеличивается в префронтальной коре и в некоторых областях гиппокампа и гипоталамуса в течение 1 ч после 24-часовой процедуры разлучения (Vazquez et al., 2003). С другой стороны, имеется лишь несколько исследований, оценивающих изменение концентрации кортикостерона и экспрессии связанных со стрессом генов в различных областях мозга после стресса у детенышей. Ранее было показано, что длительное отделение не изменяет базальную концентрацию кортикостерона на 3-й, 6-й, 9-й и 12 постнатальный день (Lajud et al., 2012), что хорошо согласуется с нашими данными.

Динамическая пластичность всех компонентов ГГНС детенышей и множество компенсаторных механизмов, по-видимому, может объяснить, почему эффекты неонатального стресса зависят от типа стресса, периода развития и возраста, в котором они оцениваются (Enthoven et al., 2008; Teicher et al., 2016). Исследования на мышах и крысах показывают, что уровень кортикостерона достигает минимума на ПД9, а затем начинает увеличиваться (Lajud et al., 2012; Witek-Janusek, 1988). Следует отметить, что ГГНС детенышей легко десенсибилизируется к многократному ежедневному отделению от матери, а уровни АКТГ и кортикостерона перестают повышаться уже во время третьей процедуры отделения (Enthoven et al., 2008). Интересно, что эти закономерности справедливы только для одинаковых повторяющихся изо дня в день стрессовых воздействий. В работе (Enthoven et al., 2008) исследователи показали, что введение дополнительного стресса (например, стресса новизны в течение 30 минут) после 3-часовой процедуры отделения от матерей вызывает стабильное повышение уровней АКТГ и кортикостерона во время процедур отделения от матери. Соответственно, можно предположить, что негативные последствия длительного отделения от матерей зависят от степени активации ГГНС при первой процедуре отделения и скорости адаптации ГГНС к повторным процедурам отделения.

Отставленные во времени эффекты длительного отделения детенышей от матерей на базальное состояние ГГНС противоречивы. Большинство исследований на мышах не находят влияние на базальный уровень кортикостерона или экспрессию *Crh* в гипоталамусе (van Bodegom et al., 2017). Усиление экспрессии *Crh* у взрослых животных с историей раннего постнатального стресса наблюдалось лишь в работах на крысах или на отдельных линиях мышей, чувствительных к стрессовым воздействиям (Aisa et al., 2007; Maniam and Morris, 2010; Plotsky and Meaney, 1993). Таким образом, одна из возможных причин появления противоречивых результатов

влияния на базальную активность ГГНС может заключаться в зависимости отставленных во времени эффектов длительного отделения от матерей от вида животного (мыши или крысы) или от линии мышей. Такие линии мышей, как BALB/cJ и DBA/2J и крысы линии F344, более чувствительны к стрессу, а отсроченные эффекты ДО на грызунов этих линий могут быть более выраженными (Novais et al., 2017) Интересно, что генетические особенности у человека также влияют на чувствительность к стрессу (Assary et al., 2018).

4.2. Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит к снижению двигательной активности и нарушению пространственной памяти у взрослых самцов

Наши результаты показали, что длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит у взрослых животных к снижению двигательной и исследовательской активности, а также нарушению пространственной памяти и распознавания новых объектов, но не влияет на параметры тревожности, социального поведения и скорость обучения. Снижение двигательной активности у взрослых животных с историей раннего постнатального стресса было также показано и в других работах на мышцах (Varghese et al., 2006). Недавний мета-анализ, который включал 49 исследований на грызунах, показал, что длительное отделение от матерей в раннем возрасте усиливает тревожное поведение в тесте приподнятого крестообразного лабиринта у крыс, но не у мышей (Wang et al., 2020a). С другой стороны, как показано в другом мета-анализе, различные типы стресса в раннем возрасте вызывают сходные когнитивные нарушения в задачах, зависящих от дорсального гиппокампа и префронтальной коры, таких как тест водного лабиринта Морриса и тест распознавания новых объектов, как у мышей, так и у крыс. (Rocha et al., 2021). Влияние раннего постнатального стресса на другие поведенческие характеристики, такие как социальное поведение непоследовательны (Loi et al., 2017; Tractenberg et al.,

2016b). У человека стресс в детстве приводит к усилению симптомов тревожности во взрослом возрасте (Poole et al., 2017). Таким образом, длительное отделение от матерей привело к выраженным отставленным во времени фенотипическим поведенческим проявлениям. Однако, как и в случае с влиянием раннего постнатального стресса на ГНС и структурно-функциональные изменения в мозге, влияние на поведение также в значительной степени видоспецифично и некоторые эффекты, которые наблюдаются в работах на крысах не воспроизводятся в работах на мышах.

4.3. Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит к выраженным изменениям в экспрессии генов в префронтальной коре у взрослых самцов

Анализ транскриптома префронтальной коры головного мозга позволил нам выявить гены с измененным уровнем экспрессии у группы ДО по сравнению с контрольной группой. Мы обнаружили, что под влиянием раннего постнатального стресса изменяется экспрессия 648 генов. Среди дифференциально экспрессирующихся генов в группе ДО представлены гены, связанные с развитием нервной системы, развитием аксонов и дендритов, кальций-зависимыми процессами, а также связанные с формированием миелиновой оболочки аксонов. В частности, среди ДЭ генов были гены глутаматной (*Gria2*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Homer1*) и ГАМК-ергической (*Gabrb2*, *Gabarapl2*) нейромедиаторных систем. Кроме того, среди ДЭ есть гены, связанные с регуляцией направления роста аксонов и клеточного распознавания (*Cdh23*, *Pcdh15*, *Cdh13*) и межклеточным сигналингом (*Efnb3*). Также в группе ДО мы обнаружили снижение экспрессии нейротрофического фактора мозга *Bdnf*. Снижение экспрессии *Bdnf* после раннего постнатального стресса подтверждается также в других работах на грызунах (Lippmann et al., 2007b; Nair et al., 2007a; Roceri et al., 2004). В то же самое время, данные по экспрессии генов глутаматергической системы противоречивы. Так, при анализе транскриптома медиальной

префронтальной коры, сделанном на модели длительного отделения от матерей с дополнительным ранним отсаживанием (Maternal Separation with Early Weaning), было выявлено, наоборот, усиление экспрессии генов субъединиц NMDA рецептора (*Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2d*, *Grin3a*) и метаботропных рецепторов (*Grm1*, *Grm4*) (Bordner et al., 2011). Таким образом, данные по экспрессии генов глутаматных рецепторов достаточно разнородны и зависят от вида животного и используемого типа стресса. Стоит также отметить, что изменение экспрессии генов не всегда коррелирует с изменением экспрессии белка и, соответственно, функциональной активностью системы. Однако, работы на крысах (Roceri et al., 2002b) показывают однонаправленное снижение как мРНК *Grin2a* и *Grin2b*, так и уровня белкового продукта этих генов в гиппокампе.

Помимо генов нейрональной пластичности, после ДО в детстве у взрослых животных наблюдалось усиление экспрессии различных генов рибосомальных белков (*Rplp1* и *Rplp2*, *Rpl10*, *Rpl4l*, *Rps3*, *Mrpl28*, *Mrpl52*, *Rps*, *Rpl*). По всей вероятности, это свидетельствует об интенсификации процессов трансляции. Несмотря на то, что эти процессы являются энергозатратными, их активация, по-видимому, необходима для адаптации на клеточном уровне. В других исследованиях также было показано, что экспрессия рибосомальных генов может изменяться под влиянием различных стрессовых воздействий, например, под влиянием хронического стресса социальных поражений (Smagin et al., 2016) или у победителей после агонистических конфронтаций (Smagin et al., 2018).

Другим большим кластером ДЭ генов в ДО группе были гены, связанные с процессами миелинизации. Кроме быстрой передачи потенциалов действия, миелин обеспечивает стабилизацию нейронных связей (Broggini et al., 2016). Миелинизация играет важную роль в процессах обучения и памяти, аномальная миелинизация связана с неврологическими расстройствами и психическими заболеваниями. Мы нашли, что в ДО группе

была повышена экспрессия генов *Mal*, *Plp*, *Plp1*, *Mbp*, *Mag*, кодирующих белки, являющиеся структурными компонентами миелиновых оболочек, и генов *Cal3st11*, *Fa2h*, *Ugt8a*, кодирующие ферменты синтеза липидных компонентов миелиновой оболочки. Экспрессия гена *Nkx6.2*, транскрипционного фактора, который играет важную роль в дифференцировке олигодендроцитов и контролирует экспрессию генов *Plp1* и *Mbp* (Gonzalez et al., 2017) была также повышена.

Эти результаты по усилению экспрессии генов миелинизации у ДО группы являются неожиданным, поскольку обычно воздействие стресса ассоциировано со снижением процессов миелинизации (Antontseva et al., 2020). Тем не менее, следует отметить, что данные ПЦР на расширенных выборках животных не подтвердили достоверное изменение этих генов между группами, что по всей видимости связано с гетерогенностью эффектов на стресс у животных ДО группы. Влияние раннего постнатального стресса на процессы миелинизации показано у 21-ти дневных крыс, после длительного отделения от матерей (Yang et al., 2017a). У крыс на ПД21 с опытом стресса была снижена экспрессия гена *Mbp* в префронтальной коре и толщина кортикальной миелиновой оболочки. Кроме того, у них наблюдалось повышение количество созревающих олигодендроцитов (NG2+), в то время как количество зрелых олигодендроцитов (Olig2+, CC1+) было значительно ниже чем у контрольных животных. Следовательно, длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период может нарушать дифференцировку олигодендроцитов и влиять на образование зрелых олигодендроцитов; это явление может быть причиной гипомиелинизации у стрессированных крыс. Авторы подтвердили свою гипотезу, показав, что экспрессия генов *Mbp* и *Mobp*, продукты которых являются основными белками миелиновой оболочки, снижается при раннем постнатальном стрессе, в то время как экспрессия *ID2* и *ID4* (ингибиторов дифференцировки олигодендроцитов) наоборот активируется (Yang et al.,

2017a). Полногеномные данные на префронтальной коре взрослых животных с использованием другого типа стресса - ежедневное длительное отделение от матерей в течение первых двух недель жизни в сочетании с ранним отсаживанием из материнской клетки на ПД17, демонстрируют снижение экспрессии ключевых генов миелинизации таких как *Mag*, *Mal*, *Mbp*, *Mobp*, *Mog*, *Omg*, *Opalin* и *Plp1* (Bordner et al., 2011). Кроме того, снижение уровня миелинизации ассоциировано с повышением чувствительности к стрессу, что было показано в двух мета-анализах (Gururajan, 2022; Reshetnikov et al., 2022). По всей вероятности, повышение экспрессии миелиновых генов является своеобразным механизмом адаптации к постнатальному стрессу.

4.5. Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит к умеренным изменениям профиля H3K4me3 в префронтальной коре у взрослых самцов

Анализ профиля активного хроматина в префронтальной коре взрослых животных с историей раннего постнатального стресса выявил изменения в небольшом количестве пиков H3K4me3. Причем плотность распределения H3K4me3 во всех 45 дифференциально триметилированных пиках была выше в группе ДО. Среди генов, промоторные области которых оказались дифференциально триметилированными, несколько генов было связано с глутаматной системой. Ген *Grm3* кодирует глутаматный рецептор mGluR3, основной регулятор функций префронтальной коры (Walker et al., 2015), изменение экспрессии которого связано с нарушениями рабочей памяти (Lainiola et al., 2014), а также с развитием биполярного расстройства (Kandaswamy et al., 2013). Ген *Sdf2* кодирует белок, взаимодействующий с другим рецептором глутамата, mGluR1b, что позволяет предположить его участие в фолдинге и транспорте последнего (Francesconi et al., 2009). Ген *Pclo* кодирует нейроспецифический белок Piccolo, высоко экспрессирующийся в коре головного мозга и участвующий в транспорте

синаптических пузырьков. *Piccolo* играет ключевую роль в синаптической пластичности, контролируя внеклеточные уровни глутамата (Ibi et al., 2010). Интересно, что экспрессия *Pclo* была снижена у взрослых животных с историей ДО, как было показано нами на основе анализа транскриптома. Фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PtdIns(4,5)P₂), образующийся в результате ферментативного действия продукта гена *Pip4k2a*, играет важную роль в мембранном транспорте, регуляции слияния синаптических везикул (глутамат, дофамин) с плазматической мембраной и регулирует продолжительность передачи сигнала (Cremona et al., 1999; Fedorenko et al., 2008; Roth, 2004). Среди других генов с различной плотностью распределения H3K4me₃ в их промоторных регионах можно выделить гены *Arl6ip6*, *March1* и *Wasl*, белковые продукты которых регулируют формирование и поддержку дендритных шипиков (Jain et al., 2014; Li et al., 2013; Miyazaki et al., 2005), а также *Zfp608*, *Flrt2* и *Atad2b*, белковые продукты которых участвуют в аксоногенезе, дифференцировке и миграции нейронов (Ayoub et al., 2011; Jackson et al., 2015; Leachman et al., 2010).

Кроме того, среди генов с дифференциальной плотностью распределения H3K4me₃ в промоторном регионе были гены, связанные с ремоделированием хроматина, что может указывать на вовлеченность изменения профиля хроматина в опосредование эффектов стресса в раннем возрасте. Гистоновый шаперон *Supt6b* участвует в поддержании структуры хроматина (Begum et al., 2012; Wang et al., 2013). Продукт *Ubr4*, по-видимому, является компонентом цитоскелета в цитоплазме и субъединицей каркаса хроматина в ядре (Tasaki et al., 2005). Среди генов с измененным профилем H3K4me₃ были также гены, связанные с эпигенетической инактивацией транскрипции, кодирующие гистонметилтрансферазу *Ash1l*, специфически метилирующие Lys-36 гистона H3 (H3K36me) (Tanaka et al., 2007), *Cir1* и *Phf12*, участвующие в сборке гистондеацетилазных комплексов (Yochum and Ayer, 2001; Zhou and Hayward, 2001), а также ген *Wdr77*,

связанный с активацией транскрипции, кодирующий субъединицу метилтрансферазного комплекса, модифицирующую специфические аргинины в диметиларгинины (Stora et al., 2015).

Среди этих генов нами были выбраны 11 генов для анализа экспрессии методом ПЦР, и только 3 (*Pip4k2a*, *Ndr3* и *Ddias*) из 11 генов показали усиление экспрессии в ДО группе, что хорошо согласуется с увеличением плотности распределения H3K4me3 в их промоторных регионах. Следует отметить, что, хотя на уровне всего генома обычно существует сильная корреляция между экспрессией генов и уровнями H3K4me3, это не обязательно верно для любого конкретного гена, поскольку регуляция экспрессии генов обычно зависит от множества факторов. Учитывая малую амплитуду наблюдаемых изменений H3K4me3, можно предположить, что они вряд ли приведут к фенотипически выраженным изменениям экспрессии соответствующих генов, а значит, их вклад в изменения экспрессии может быть незначителен. Наоборот, учитывая высокую функциональную дивергенцию нейронов коры, можно предположить, что соответствующие изменения в том или ином наборе клеток сглаживаются остальной клеточной массой. К сожалению, поскольку транскриптомный и эпигеномный анализ были проведены на образцах разных животных, мы не можем провести корреляционный анализ между уровнем экспрессии гена и плотностью распределения H3K4me3 в их промоторном регионе.

Наиболее вероятное объяснение отсутствия выраженных изменений в ландшафте H3K4me3 после стресса в ранний постнатальный период, заключается в том, что все выраженные изменения, вызванные стрессом в раннем возрасте, могли быть нивелированы к взрослому возрасту. Схожие результаты были получены на модели выраженного когнитивного дефицита у взрослых потомков с историей активации материнского иммунитета в пренатальный период, которая была вызвана однократной дозой PolyI:C (Connor et al., 2012). Несмотря на стойкий дефицит рабочей памяти, у

взрослых мышей, подвергшихся воздействию PolyI:C, не было обнаружено каких-либо значительных изменений в эпигенетическом ландшафте H3K4me3 в коре головного мозга. Однако авторы продемонстрировали, что профиль H3K4me3 ряда генов чувствителен к острой активации IL-6 в первичных культурах клеток переднего мозга плода. Точно так же было показано, что разлучение с матерью в раннем возрасте не оказывает существенного влияния на паттерн H3K4me3 в коре у мышей подросткового возраста (ПД30) всего через 2 недели после воздействия стресса (Carlyle et al., 2012), хотя его влияние на поведение и экспрессию генов наблюдается и у взрослых животных (Bordner et al., 2011).

4.6. Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период приводит к повышению чувствительности к хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте

В нашем исследовании мы обнаружили, что стресс в раннем возрасте модулирует эффекты хронического стресса социальных поражений во взрослом возрасте. У самцов мышей с историей стресса в ранний постнатальный период во взрослом возрасте в ответ на дополнительный стресс наблюдалось более выраженное повышение уровня кортикостерона и усиление тревожности, а также специфические изменения в экспрессии генов, в альтернативном сплайсинге и в распределении модификации хроматина H3K4me3 в префронтальной коре. Между тем, обе группы мышей, подвергнутые хроническому стрессу социальных поражений (ДО+СС и СС), демонстрировали сниженное социальное поведение. В целом, мы предполагаем, что стресс в раннем возрасте влияет только на определенные поведенческие домены в отношении восприимчивости к последующим стрессам. Для выявления специфических изменений экспрессии генов у более восприимчивых животных, мы проанализировали гены, экспрессия которых специфически изменяется в группе с комбинированными стрессовыми воздействиями.

В группе ДО+СС была усилена экспрессия генов, продукты которых связаны с синтезом гемоглобина (*Hbb-bs*, *Hba-a1*, *Hbb-bt* и *Alas2*). Точная роль гемоглобиновых генов в активности нейронов до конца не выяснена. Считается, что гемоглобиновые белки играют нейропротекторную роль и реализуют защиту нейронов от окислительного стресса (Xie and Yang, 2016). Повышенная экспрессия генов гемоглобина и фермента синтеза гема обнаружена в гиппокампе, миндалевидном теле, прилежащем ядре и вентральной области покрышки в ответ на хронический стресс социальных поражений и в других исследованиях (Bagot et al., 2016; Pena et al., 2019b; Stankiewicz et al., 2015). По всей видимости, изменения экспрессии этих генов не являются специфическими для префронтальной коры, что позволяет предположить, что они, скорее всего, играют неспецифическую роль в адаптации к стрессу на клеточном уровне. Необходимы дальнейшие исследования для выявления молекулярных механизмов, с помощью которых гемоглобины в головном мозге обеспечивают адаптацию к стрессу.

Среди генов с повышенной экспрессией, которые показали изменения экспрессии только в группе ДО+СС, мы идентифицировали гены *Ciart* и *Dbp*, кодирующие факторы транскрипции из семейства ключевых регуляторов циркадианного ритма (Takahashi, 2017). В настоящее время общепризнано, что многие психические расстройства, вызванные стрессом, характеризуются нарушениями циркадных ритмов, поскольку циркадные часы и система реакции на стресс тесно взаимосвязаны и реципрокно регулируются (Landgraf et al., 2014; Rao and Androulakis, 2019). Учитывая, что экспрессия генов, кодирующих ключевые компоненты, регулирующие циркадный ритм, не изменилась в группе ДО без предъявления дополнительного стресса, наблюдаемая повышенная экспрессия *Ciart* и *Dbp* у мышей с ДО+СС вероятно связана именно с хроническим стрессом социальных поражений и может свидетельствовать о нарушениях гомеостаза циркадианнных ритмов.

Кроме того, в группе ДО+СС, как и в группе ДО была снижена экспрессия гена сортилин-родственного рецептора (*Sorcs3*), который вместе с *Homer1* является сильным регулятором функций рецептора глутамата (Christiansen et al., 2017). Исследования на людях показали, что однонуклеотидные полиморфизмы в генах *HOMER1* и *SORCS3* коррелируют с предрасположенностью к депрессии и другим психопатологиям (Howard et al., 2019; Rietschel et al., 2010). Кроме того, отмечено снижение экспрессии генов, продукты которых связаны с регуляцией концентрации кальция в цитозоле и эндоплазматическом ретикулуме (*Smoc1* и *Stim2*).

Наиболее интересный результат был получен по гену *Homer1*. Анализ экспрессии его различных транскриптов позволяет предположить, что группа ДО+СС характеризуется более низкой экспрессией *Homer1* из-за специфического подавления транскрипта *Homer1a* (Рис. 24). *Homer1* имеет 9 белковых изоформ, 3 из них (*Homer1b*, *Homer1c* и *Homer1d*) являются “длинными” изоформами, которые содержат все функциональные домены, у двух других (*Homer1a* и *Ania3* (*Homer1m*)) отсутствует С-концевой домен, а также 4 изоформы (*Homer1e*, *f*, *g* и *h*), у которых отсутствуют частично или полностью оба функциональных домена (Shiraishi-Yamaguchi and Furuichi, 2007).

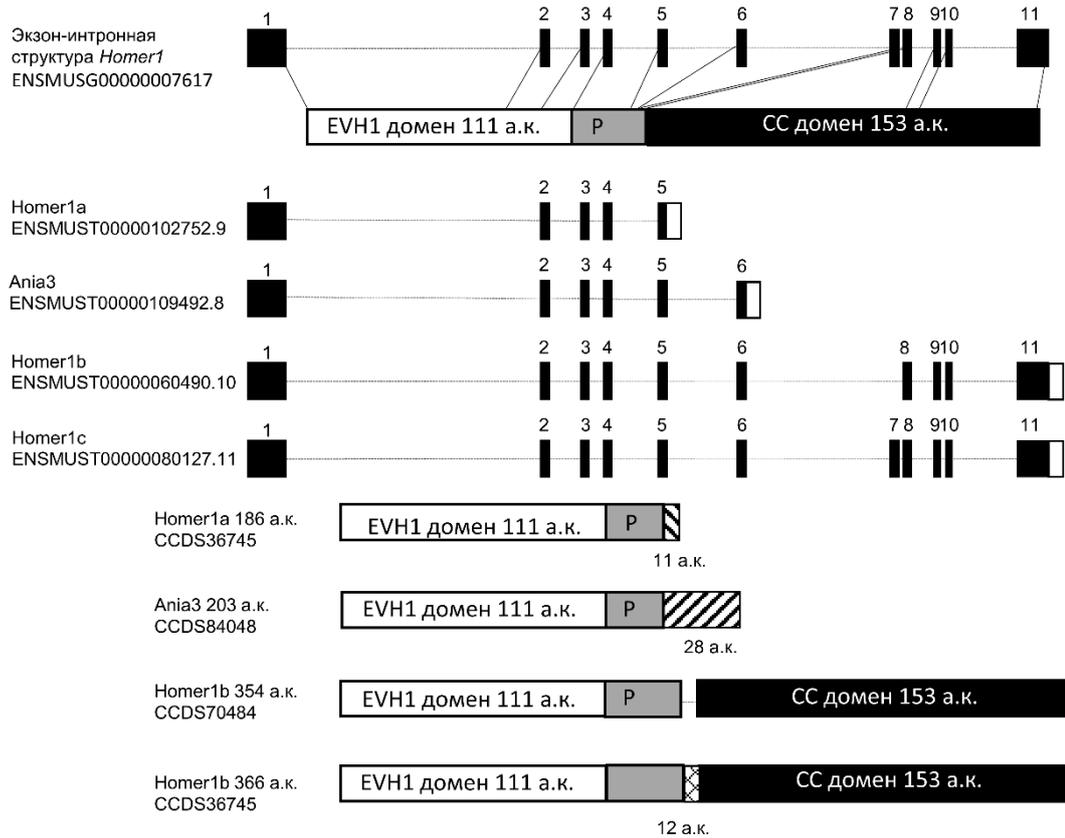


Рисунок 24. Структура транскриптов *Homer1* и его белковых изоформ. *Homer1* содержит 11 экзонов. Первые 4 экзона кодируют последовательность EVH1 домена, 5-й экзон кодирует последовательность содержащую Р-мотив (P), 8-11 экзоны кодируют CC домен.

В состоянии покоя в нейронах *Homer1* транскрибируется с образованием конститутивных транскриптов *Homer 1b/c*. Активация нейронов стимулирует образование коротких транскриптов *Homer1a* и *Ania3*, которые являются генами раннего ответа (*immediate early genes*), экспрессия этих изоформ обеспечивает адаптацию к стрессу на молекулярном уровне. Механизм переключения экспрессии с длинных транскриптов на короткие до конца не ясен, считается что он, вероятно, связан с преждевременной остановкой РНК-полимеразы II, расщеплением мРНК и полиаденилированием образовавшегося 3' конца (Flavell et al., 2008). Показано, что в этом процессе важную роль играет транскрипционный фактор MEF2 и регуляторная последовательность TTGTTGGG,

расположенная рядом с местом терминации транскрипции коротких транскриптов *Homer1* (Flavell et al., 2008).

Экспрессии *Homer1a* в кортикальных структурах и гиппокампе последовательно усиливается после рождения и достигает пика на 3-ю постнатальную неделю жизни у грызунов (Brakeman et al., 1997; Montes-Rodriguez et al., 2013). Этот процесс совпадает с периодом интенсивной реорганизации синапсов и установления устойчивых синаптических сетей. В работе на крысах было показано, что хронический стресс в пренатальном периоде приводит к усилению экспрессии мРНК и белка *Homer1a* в миндалине у ювенильных и взрослых животных (Ary et al., 2007; Buonaguro et al., 2020). В то же время, уровень *Homer1a* в гиппокампе и префронтальной коре был повышен у ювенильных животных (Ary et al., 2007) и снижен у взрослых (Buonaguro et al., 2020). С помощью *in vitro* and *in vivo* подходов было показано, что эпигенетическая регуляция *Homer1* зависит от BDNF-индуцируемого сигналинга (Mahan et al., 2012), который в значительной степени подвержен влиянию раннего постнатального стресса (Bondar and Merkulova, 2016; Roth and Sweatt, 2011). Таким образом, стресс в ранний период жизни, по всей вероятности, не оказывает прямого влияния на переключение *Homer1b/c*-*Homer1a* транскрипции, однако может оказывать влияние на активность экспрессии *Homer1*, которая в свою очередь определяет амплитуду этого переключения.

Острый стресс приводит в большинстве своем к усилению экспрессии *Homer1a* в различных регионах мозга, в то время как хронический стресс наиболее часто приводит к усилению экспрессии *Homer1b/c* изоформ в гиппокампе (Reshetnikov and Bondar, 2021). Примечательно, что эти изменения в соотношении *Homer1a*/*Homer1b/c* в гиппокампе или префронтальной коре могут определять устойчивость/чувствительность к стрессу (Li et al., 2019; Reshetnikov et al., 2020a). Эти данные хорошо согласуются с предыдущими работами, в которых показано, что индукция

экспрессии *Homer1a* в кортикальных структурах позволяет лучше приспособиться к стрессовым условиям (Szumlinski et al., 2006) и оказывает выраженный антидепрессивный эффект (Conti et al., 2007; Serchov et al., 2016; Sun et al., 2011; Sun et al., 2015). Причем усиление экспрессии *Homer1a* наблюдается как при терапии различными фармацевтическими препаратами (Serchov et al., 2016), так и с помощью других воздействий, таких как транскраниальная магнитная стимуляция (Sun et al., 2011), электроконвульсивная терапия (Conti et al., 2007), депривация сна (Conti et al., 2007) и фототерапия (Sun et al., 2015).

Данные по отставленным во времени эффектам стресса на животных говорят о том, что поведенческие нарушения и повышение чувствительности к стрессу могут быть связаны с изменением общей экспрессии *Homer1*, а не с изменением соотношения *Homer1a/Homer1b/c*. Однако, можно предположить, что именно низкая скорость индукции *Homer1a* может быть причиной негативных эффектов на поведение, поскольку специфическое действие именно короткой изоформы связывают с устойчивостью к стрессу. Подтверждение нашего предположения можно найти в работах на животных с нокаутом по *Homer1*, которые демонстрируют снижение исследовательской активности, усиление тревожности, нарушение адаптивного поведения в тесте вынужденного плавания, а также нарушение сенсомоторных реакций и когнитивных функций (Lominac et al., 2005; Szumlinski et al., 2005). Восстановление экспрессии только изоформы *Homer1a* в префронтальной коре с помощью введения векторной конструкции нивелирует большинство негативных эффектов на поведение, наблюдаемых у этих животных (Lominac et al., 2005). В то же время, восстановление экспрессии *Homer1b/c* в префронтальной коре не приводит к каким-либо поведенческим улучшениям.

Предполагают следующий механизм взаимодействия между разными изоформами. Короткая изоформа *Homer1a* конкурирует с *Homer1b/c* за связывание с адаптерными белками, приводя к диссоциации *Homer1b/c*-

Shank-GKAP-PSD95 агломератов, причем этот процесс прямо зависит от соотношения Homer1a/Homer1b/c изоформ в постсинаптическом пространстве (Рис. 25) (Hayashi et al., 2009). Помимо этого связывание Homer1a с эндоплазматическими mGluR1/5 приводит к их перемещению в постсинаптическое пространство (Ango et al., 2001), где они могут осуществлять прямое ингибирование передачи сигнала через NMDA рецепторы с помощью связывания β субъединицы G-белка mGluR1/5 рецептора с С-концом NR1 субъединицы NMDA рецептора (Bertaso et al., 2010; Moutin et al., 2012). Повышение экспрессии Homer1a и нарушение Homer1b/c-mGluR1/5 взаимодействия приводит к запуску лиганд-независимой активации mGluR1/5 (Ango et al., 2001; Cingolani et al., 2019; Hu et al., 2010). Эта активация mGluR1/5 приводит к снижению количества AMPA рецепторов на постсинаптической мембране за счет снижения уровня фосфорилирования GluA2 субъединицы AMPA рецепторов, и усилению их эндоцитоза (для детального обзора механизма смотри (Cingolani et al., 2019; Clifton et al., 2019; Hu et al., 2010; Thomazeau et al., 2020)). Индуцированное Homer1a снижение эффективности синаптической передачи посредством mGluR1/5 лежит в основе так называемой гомеостатической синаптической пластичности, которая направлена на поддержание долгосрочной стабильности молекулярных сетей (Turrigiano and Nelson, 2004). Таким образом, повышенная экспрессия Homer1a приводит к ремоделированию постсинаптической плотности.

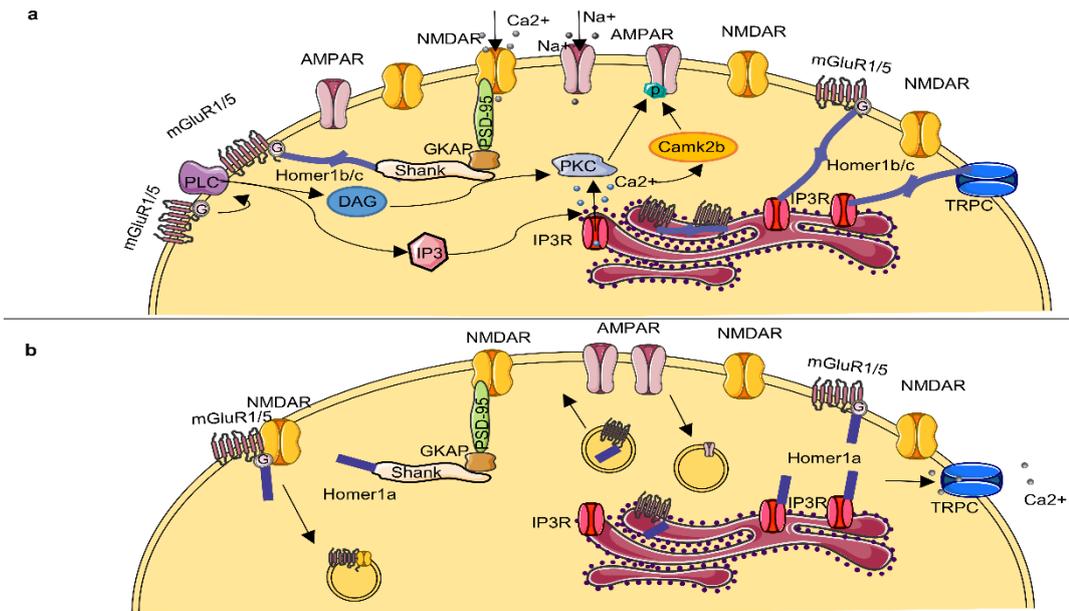


Рисунок 25. Схематическое представление постинаптической мембраны и роли Homer1 в синаптической пластичности **a.** Конститутивно экспрессирующаяся изоформа Homer1b/c обеспечивает взаимосвязь mGluR1/5 с NMDAR рецепторами через белок-белковые комплексы Shank-GKAP-PSD-95; обеспечивает связь mGluR1/5 и кальциевых каналов TRPC с IP3R на постсинаптической мембране. Взаимодействие Homer1b/c с другими белками формирует скаффолд и создает возможность для долговременной потенциации и эффективной сигнальной трансдукции. Высвобождение депонированного Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулаума во внутриклеточное пространство приводит к активации протеин-киназы Camk2b, которая наряду с протеин-киназой C участвует в фосфорилировании C конца субъединиц AMPAR, что, в свою очередь, препятствует их эндоцитозу и способствует стабилизации на поверхности постсинаптической мембраны. **b.** Молекулярные механизмы Homer1a зависимого снижения синаптической передачи (downscaling). Короткая изоформа Homer1a конкурирует с Homer1b/c за сайты связывания, приводя к нарушению мультимерных комплексов mGluR1/5-Homer1b/c-Shank, mGluR1/5-Homer1b/c-IP3R и переключению активации mGluR1/5 с лиганд зависимой на лиганд независимую. Комплексы mGluR1/5-Homer1a способны ингибировать активность NMDAR с помощью β субъединицы G-белка mGluR1/5, что приводит к их последующему эндоцитозу. Снижение уровня протен-киназ приводит к снижению фосфорилирования субъединиц AMPAR и стимулирует их эндоцитоз.

Поскольку Homer1b/c может модулировать различные формы синаптической пластичности, но, в противовес, Homer1a не приводит к ремоделингу постсинаптической плотности, можно предположить, что

эффекты этих изоформ не могут быть объяснены только изменением скорости синаптической передачи. Недавние исследования предполагают, что антидепрессивные эффекты, вызванные индукцией Homer1a, связаны с активацией ERK сигнального каскада, причем как через BDNF-Ras-ERK, так и через A₁R- ERK1,2 пути (Serchov et al., 2016). Другая работа (Li et al., 2019) демонстрирует, что усиление чувствительности к стрессу связано с активностью PERK-eIF2 α пути в гиппокаме.

Можно рассматривать Homer1a-зависимый ремоделинг как важный компонент “переключения” синаптической передачи, а индукцию экспрессии Homer1a как адаптацию клетки в ответ на aberrантную активацию глутаматергической передачи и, таким образом, Homer1a может выполнять нейропротекторную роль. В подтверждение этого предположения *in vitro* исследования на культурах нейронов показали, Homer1a защищает нейроны от NMDA- опосредованного повреждения (Wang et al., 2015b). Кроме того, как повышенная экспрессия Homer1a, так и снижение экспрессии Homer1b/c подавляет апоптоз в нейронах, подверженных травматическому воздействию, усиливает жизнеспособность клеток и стимулирует процессы аутофагии (Fei et al., 2014; Wang et al., 2020c). Важность Homer1a как нейропротектора подтверждает также то, что он выполняет значимую роль в гомеостатической синаптической пластичности во время сна, которая включает в себя удаление AMPA рецепторов с постсинаптической мембраны и ингибирование LTP, что обеспечивает снижение количества возбуждающих синапсов (Diering et al., 2017). Тем не менее, не смотря на то, что Homer1a приводит к подавлению LTP, Homer1a опосредованные изменения (downscaling) являются обратимыми и менее выраженными с точки зрения подавления синаптической передачи чем LTD или депотенциация (Jones, 2017).

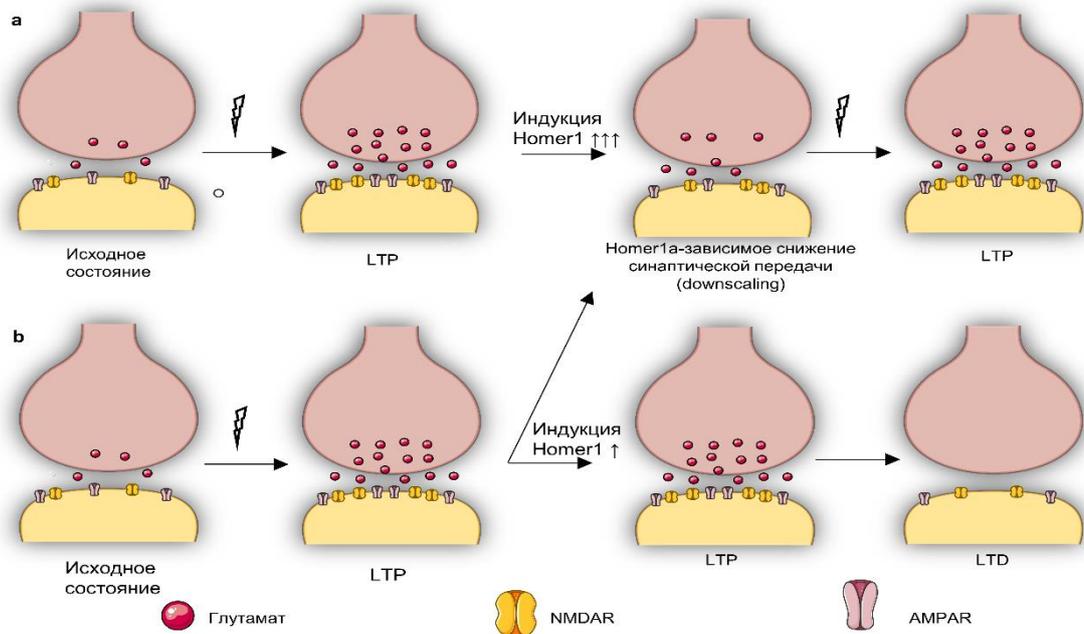


Рисунок 26. Предполагаемая роль Homer1a зависимого ремоделинга в устойчивости к стрессу и синаптической передачи **а.** При высоком уровне индукции Homer1a ($\uparrow\uparrow\uparrow$) в ответ на долговременную потенциацию (long-term potentiation, LTP) происходит обратимое подавление синаптической передачи (downscaling) необходимое для защиты клетки от чрезмерной активации глутаматергической передачи и адаптации клетки для последующей LTP. Эта модель характерна для устойчивых индивидуумов или непродолжительного стрессового воздействия. **б.** При низком уровне индукции Homer1a (\uparrow) в ответ на LTP лишь в части синапсов наблюдается Homer1a зависимое подавление активности (downscaling), другие синапсы продолжают находится в состоянии LTP, после чего неизбежно наступает фаза долговременной депрессии (long-term depression, LTD), которая сопровождается более глубоким ингибированием синаптической передачи. Эта модель характерна для чувствительных индивидуумов или ситуации хронического стресса.

Таким образом, по всей видимости, именно возможность быстрой адаптации синапсов благодаря Homer1a-зависимому ремоделингу постсинаптической плотности в ответ на различные стимулы обеспечивает устойчивость к стрессовым воздействиям за счет синаптической реорганизации и предотвращению более сильного ингибирования синаптической передачи в нейронных сетях (Рис. 26), которые участвуют в ответе на стресс или ответственны за психоэмоциональное состояние. Этот механизм может быть нарушен у группы ДО+СС у которой наблюдается

снижение экспрессии *Homer1a* и, по всей видимости, нарушение того механизма может быть причиной наблюдаемой у этой группы животных повышенной чувствительности к социальному стрессу.

4.7. Длительное отделение от матерей в ранний постнатальный период влияет на изменение профиля H3K4me3 в префронтальной коре взрослых самцов после воздействия хронического стресса социальных поражений

В нашей работе мы обнаружили, что хронический стресс социальных поражений вызывает лишь незначительные изменения триметилирования H3K4 в промоторах генов в рамках всего генома. Кроме того, в большинстве промоторов изменения триметилирования H3K4 затрагивали только узкие пики в одиночных нуклеосомах. Функциональное значение такого изменения остается неясным, поскольку изменения уровней H3K4me3 в промоторах генов слабо коррелируют с их экспрессией. Эти данные по умеренному влиянию стресса на распределение плотности H3K4me3 были аналогичны результатам, полученным на префронтальной коре взрослых животных с опытом раннего постнатального стресса без предъявления дополнительного стресса во взрослом возрасте.

H3K4me3 обычно находится в промоторной области генов и является маркером открытого состояния хроматина и активной транскрипции генов (Guenther et al., 2007; Heintzman et al., 2007; Santos-Rosa et al., 2002). Тем не менее, недавние исследования показывают, что роль H3K4me3 в регуляции транскрипции не однозначна (Howe et al., 2017). В исследованиях на дрожжах было продемонстрировано, что снижение уровня H3K4me3 оказывает лишь незначительное влияние на глобальную транскрипцию (Churchman and Weissman, 2011). Исследования на дрожжах также показывают, что профиль H3K4me3 и экспрессия генов демонстрируют временные комбинаторные паттерны, определяющие функционально родственные гены (Kuang et al., 2014). Кроме того, в большинстве генов

высокий уровень H3K4me3 в промоторных областях наблюдается после активной транскрипции РНК (Kuang et al., 2014). Более того, уровни H3K4me3 сохраняются после инактивации транскрипции и снижаются до базового (фонового) уровня в течение 5 ч, что указывает на то, что H3K4me3 может сохраняться в качестве “молекулярной памяти” недавней транскрипционной активности (Ng et al., 2003). Таким образом, вероятно, существует как минимум два кластера генов: в первом плотность H3K4me3 в промоторах коррелирует с экспрессией генов, тогда как в другом кластере это влияние не обнаружено, а изменения триметилирования H3K4 позволяют предположить возможные различия в уровни экспрессии этих генов за несколько часов до оценки транскрипционной активности (Kuang et al., 2014).

Мы обнаружили, что среди всех выявленных узких и широких пиков H3K4me3 с дифференциальной плотностью распределения ($p < 0,05$, $FC > 1,3$) только 25 пиков находились в промоторных регионах ДЭ генов хотя бы в одной из исследуемых групп, причем профиль H3K4me3 в этих пиках изменяется в одном направлении с транскрипцией гена (Таблица 6). Мы полагаем, что изменение уровней H3K4me3 в промоторной области этих генов связано с уровнем их экспрессии. Тем не менее, эти гены не образуют единой функциональной сети. Следует отметить, что среди этих генов есть два (*Dbr* и *Sorcs3*), которые специфически изменяли экспрессию только в группе ДО+СС. Продукты этих генов участвуют в циркадном ритме и передаче сигналов глутамата.

Таблица 6. Список ДЭ генов ($p < 0.05$, $FC > 1.3$) и пиков H3K4me3 с измененной плотностью распределения ($p < 0.05$, $FC > 1.3$) в промоторах этих генов, с одинаковым направлением изменений.

Наименование гена	Координат пика	Данные ChIP-seq			Данные RNA-seq		
		log ₂ FC	p.val	p.adj	log ₂ FC	p.val	p.adj
СС против Контроля							
<i>Fam193b</i>	chr13:55570922-55571069	0.68	1.13E-04	0.57	0.55	2.26E-05	0.04

<i>4833412C05Rik</i>	chr7:67803981-67804128	-0.71	4.32E-03	1.00	-0.84	1.99E-02	0.48
<i>Phf2os1</i>	chr13:48870962-48871109	0.85	7.15E-03	1.00	0.60	3.93E-02	0.57
<i>Wtip</i>	chr7:34133071-34133218	0.70	1.05E-02	1.00	0.59	1.83E-02	0.47
<i>5730522E02Rik</i>	chr11:26210362-26210513	0.56	1.12E-02	1.00	0.58	2.24E-02	0.49
<i>4930539J05Rik</i>	chr3:135439348-135439495	0.45	1.33E-02	1.00	0.54	4.07E-02	0.58
<i>Adamts9</i>	chr6:92942759-92942906	0.86	3.36E-02	1.00	0.51	4.28E-02	0.59
<i>Thsd1</i>	chr8:22227149-22227286	0.56	3.38E-02	1.00	0.76	1.18E-03	0.19
ДО+СС против Контроля							
<i>Dbp</i>	chr7:45704595-45704742	1.25	7.42E-03	1.00	0.52	1.22E-05	0.02
<i>Dbp</i>	chr7:45705278-45705423	0.46	2.45E-02	1.00	0.52	1.22E-05	0.02
<i>Sorcs3</i>	chr19:48206280-48206427	-0.51	2.69E-03	1.00	-0.40	2.65E-05	0.02
<i>Synj2</i>	chr17:5940894-5941041	-0.71	7.55E-03	1.00	-0.45	5.20E-04	0.17
<i>Pde7b</i>	chr10:20724900-20725057	-1.43	1.89E-02	1.00	-0.40	3.30E-07	0.00
<i>Gm14295</i>	chr2:176798984-176799131	1.31	7.43E-03	1.00	0.40	4.69E-02	0.84
<i>Dgka</i>	chr10:128744039-128744186	0.41	2.08E-02	1.00	0.39	7.35E-03	0.53
<i>Lmbr11</i>	chr15:98917410-98917557	0.51	2.42E-02	1.00	0.45	3.58E-03	0.42
<i>Firre</i>	chrX:50634603-50634750	1.03	3.02E-02	1.00	0.44	2.47E-02	0.77
<i>Gm14295</i>	chr2:176798833-176798984	1.00	3.36E-02	1.00	0.40	4.69E-02	0.84
<i>Mtmr11</i>	chr3:96162328-96162475	0.71	3.75E-02	1.00	0.44	1.84E-02	0.73
<i>Firre</i>	chrX:50634443-50634590	0.79	4.08E-02	1.00	0.44	2.47E-02	0.77
<i>Efcab10</i>	chr12:33395124-33395271	0.62	4.65E-02	1.00	0.43	4.59E-02	0.84
<i>Phf2os1</i>	chr13:48870962-48871109	0.59	4.68E-02	1.00	0.60	2.57E-02	0.77
ДО+СС против СС							
<i>Fbln2</i>	chr6:91212727-91212874	-0.71	6.39E-03	1.00	-0.49	4.23E-02	1.00
<i>Podxl</i>	chr6:31563848-31563995	-0.54	1.25E-02	1.00	-0.42	1.92E-02	1.00
<i>Txnip</i>	chr3:96556670-96561615	0.39	5.96E-04	1.00	0.45	1.85E-03	1.00

Чтобы найти общие гены, связанные со стрессом, промоторы которых продемонстрировали изменение триметилирования H3K4, мы сравнили широкие пики H3K4me3, плотность которых изменялась в группах,

подвергнутых хроническому стрессу социальных поражений (СС и ДО+СС). Мы выявили снижение плотности распределения H3K4me3 в промоторе гена *Ngf*, кодирующего фактор роста нервов, принимающего участие в нейрональной пластичности (Berry et al., 2012), и *Rorc*, кодирующего орфанный ядерный рецептор гамма, являющийся компонентом циркадного ритма и участвующие в индукции гена *Bmal1* (Sato et al., 2004).

Сравнение двух групп, подвергшихся СС (ДО+СС против СС), выявило в группе ДО+СС повышенную плотность распределения H3K4me3 в промоторе ключевого гена циркадного ритма *Per1*. Интересно, что в группе ДО также было найдено изменение плотности распределения H3K4me3 в промоторе *Nr1d1*, который (как и *Per1*) кодирует ключевой регулятор циркадных ритмов (Ershov et al., 2018). Таким образом, как транскриптомные данные, демонстрирующие усиление экспрессии ключевых генов циркадианного ритма (*Ciart* и *Dbp*), так и данные ChIP-seq о повышении плотности распределения H3K4me3 в промоторах *Per1* и *Dbp* у ДО+СС группы подтверждают наше предположение о том, что нарушение циркадианного ритма может быть связано с фенотипом, более восприимчивым к стрессу. В соответствии с нашими выводами исследования на людях показывают, что при депрессии часто присутствуют нарушения циркадного ритма и сна (Germain and Kupfer, 2008; Srinivasan et al., 2010).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые была произведена комплексная оценка молекулярных изменений в рамках всего генома в префронтальной коре взрослых самцов мышей, как только с опытом раннего постнатального стресса, так и после предъявления дополнительного хронического стресса социальных поражений во взрослом возрасте. Проведенный анализ транскриптомных изменений позволил выявить отставленные во времени эффекты раннего постнатального стресса на гены синаптической пластичности, глутаматной, ГАМКэргической систем и процессы миелинизации. Анализ профиля H3K4me3 позволил выявить отставленные во времени эпигенетические эффекты раннего постнатального стресса. И хотя количество генов с измененной плотностью распределения H3K4me3 было небольшим, в сочетании с транскриптомным анализом эти данные позволяют сопоставить молекулярные изменения с наблюдаемыми поведенческими нарушениями. Проведенные в нашей работе несколько независимых поведенческих экспериментов позволили установить, что взрослые самцы мышей с историей раннего постнатального стресса демонстрируют снижение двигательной, исследовательской активности, а также нарушение пространственной памяти и памяти распознавания нового объекта.

Предъявление дополнительного стресса во взрослом возрасте животным с историей раннего постнатального стресса привело к усилению тревожности, а также более сильному подъему уровня кортикостерона. У животных с комбинацией стрессов также наблюдались изменения в транскриптоме и профиле H3K4me3. В частности, только у животных с комбинацией стрессов была изменена экспрессия ключевых генов глутаматной ситемы *Homer1*, *Sorcs3* и циркадных ритмов – *Ciart*, *Dbp*. Кроме того, в промоторе гена *Dbp* также был изменен профиль H3K4me3.

Таким образом, проведенный нами анализ позволил установить гены, генные сети и эпигенетические изменения профиля H3K4me3 в промоторных регионах, связанные с ранним постнатальным стрессом и хроническим стрессом социальных поражений.

ВЫВОДЫ

1. Ранний постнатальный стресс у самцов мышей C57BL/6 привел к поведенческим нарушениям и вызвал изменения экспрессии 648 генов в префронтальной коре взрослых животных, в том числе связанных с глутаматной системой, синаптической пластичностью и процессами миелинизации.
2. Ранний постнатальный стресс у самцов мышей C57BL/6 привел лишь к небольшим изменениям в уровне гистоновой модификации H3K4me3 в отдельных районах генома в префронтальной коре взрослых животных и эти изменения не были связаны с выявленными изменениями в экспрессии генов.
3. Ранний постнатальный стресс у самцов мышей C57BL/6 привел к повышенной чувствительности к хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте и измененному профилю транскрипции ключевых генов циркадных ритмов *Ciart*, *Dbp* и гена скаффолда – *Homer1* в префронтальной коре.
4. Сочетание стресса в ранний постнатальный период и стресса социальных поражений во взрослом возрасте у самцов мышей C57BL/6 приводит к изменению в плотности распределения гистоновой модификации H3K4me3 в промоторных регионах небольшого количества генов, среди которых важную роль играют гены циркадных ритмов *Per1*, *Dbp*, *Nr1d1*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aguilera, G., Rabadan-Diehl, C., 2000. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul Peptides* 96, 23-29, Doi 10.1016/S0167-0115(00)00196-8
2. Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., Timmusk, T., 2007. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *Journal of neuroscience research* 85, 525-535, 10.1002/jnr.21139
3. Aiken, J., Buscaglia, G., Bates, E.A., Moore, J.K., 2017. The alpha-Tubulin gene TUBA1A in Brain Development: A Key Ingredient in the Neuronal Isotype Blend. *Journal of developmental biology* 5, 10.3390/jdb5030008
4. Aisa, B., Elizalde, N., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., Ramirez, M.J., 2009. Effects of Neonatal Stress on Markers of Synaptic Plasticity in the Hippocampus: Implications for Spatial Memory. *Hippocampus* 19, 1222-1231, 10.1002/hipo.20586
5. Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., Ramirez, M.J., 2007. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32, 256-266, 10.1016/j.psyneuen.2006.12.013
6. Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., Ramirez, M.J., 2008. Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience* 154, 1218-1226, 10.1016/j.neuroscience.2008.05.011
7. Akillioglu, K., Yilmaz, M.B., Boga, A., Binokay, S., Kocaturk-Sel, S., 2015. Environmental enrichment does not reverse the effects of maternal deprivation on NMDAR and Balb/c mice behaviors. *Brain research* 1624, 479-488, 10.1016/j.brainres.2015.08.009
8. Ala, U., 2020. Competing Endogenous RNAs, Non-Coding RNAs and Diseases: An Intertwined Story. *Cells-Basel* 9, Artn 1574
9. 10.3390/Cells9071574
10. Ango, F., Prezeau, L., Muller, T., Tu, J.C., Xiao, B., Worley, P.F., Pin, J.P., Bockaert, J., Fagni, L., 2001. Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* 411, 962-965, Doi 10.1038/35082096

11. Antontseva, E., Bondar, N., Reshetnikov, V., Merkulova, T., 2020. The Effects of Chronic Stress on Brain Myelination in Humans and in Various Rodent Models. *Neuroscience* 441, 226-238, 10.1016/j.neuroscience.2020.06.013
12. Arnett, M.G., Pan, M.S., Doak, W., Cyr, P.E., Muglia, L.M., Muglia, L.J., 2015. The role of glucocorticoid receptor-dependent activity in the amygdala central nucleus and reversibility of early-life stress programmed behavior. *Translational psychiatry* 5, e542, 10.1038/tp.2015.35
13. Ary, A.W., Aguilar, V.R., Szumlinski, K.K., Kippin, T.E., 2007. Prenatal stress alters limbic-cortico-striatal Homer protein expression. *Synapse* 61, 938-941, 10.1002/syn.20439
14. Assary, E., Vincent, J.P., Keers, R., Pluess, M., 2018. Gene-environment interaction and psychiatric disorders: Review and future directions. *Seminars in cell & developmental biology* 77, 133-143, 10.1016/j.semcdb.2017.10.016
15. Authement, M.E., Kodangattil, J.N., Gouty, S., Rusnak, M., Symes, A.J., Cox, B.M., Nugent, F.S., 2015. Histone Deacetylase Inhibition Rescues Maternal Deprivation-Induced GABAergic Metaplasticity through Restoration of AKAP Signaling. *Neuron* 86, 1240-1252, 10.1016/j.neuron.2015.05.024
16. Ayoub, A.E., Oh, S., Xie, Y., Leng, J., Cotney, J., Dominguez, M.H., Noonan, J.P., Rakic, P., 2011. Transcriptional programs in transient embryonic zones of the cerebral cortex defined by high-resolution mRNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 14950-14955, 10.1073/pnas.1112213108
17. Baes, C.V., Tofoli, S.M.D., Martins, C.M.S., Juruena, M.F., 2012. Assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor function in depression with early life stress - a systematic review. *Acta Neuropsychiatr* 24, 4-15, 10.1111/j.1601-5215.2011.00610.x
18. Bagot, R.C., Cates, H.M., Purushothaman, I., Lorsch, Z.S., Walker, D.M., Wang, J., Huang, X., Schluter, O.M., Maze, I., Pena, C.J., Heller, E.A., Issler, O., Wang, M., Song, W.M., Stein, J.L., Liu, X., Doyle, M.A., Scobie, K.N., Sun, H.S., Neve, R.L., Geschwind, D., Dong, Y., Shen, L., Zhang, B., Nestler, E.J., 2016. Circuit-wide Transcriptional Profiling Reveals Brain Region-Specific Gene Networks Regulating Depression Susceptibility. *Neuron* 90, 969-983, 10.1016/j.neuron.2016.04.015

19. Bagot, R.C., van Hasselt, F.N., Champagne, D.L., Meaney, M.J., Krugers, H.J., Joels, M., 2009. Maternal care determines rapid effects of stress mediators on synaptic plasticity in adult rat hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem* 92, 292-300, 10.1016/j.nlm.2009.03.004
20. Baj, G., Del Turco, D., Schlaudraff, J., Torelli, L., Deller, T., Tongiorgi, E., 2013. Regulation of the spatial code for BDNF mRNA isoforms in the rat hippocampus following pilocarpine-treatment: a systematic analysis using laser microdissection and quantitative real-time PCR. *Hippocampus* 23, 413-423, 10.1002/hipo.22100
21. Baj, G., Leone, E., Chao, M.V., Tongiorgi, E., 2011. Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 16813-16818, 10.1073/pnas.1014168108
22. Barnard, E.A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N., Langer, S.Z., 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacological reviews* 50, 291-313,
23. Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136, 215-233, 10.1016/j.cell.2009.01.002
24. Begum, N.A., Stanlie, A., Nakata, M., Akiyama, H., Honjo, T., 2012. The histone chaperone Spt6 is required for activation-induced cytidine deaminase target determination through H3K4me3 regulation. *The Journal of biological chemistry* 287, 32415-32429, 10.1074/jbc.M112.351569
25. Berardelli, R., Karamouzis, I., D'Angelo, V., Zichi, C., Fussotto, B., Giordano, R., Ghigo, E., Arvat, E., 2013. Role of mineralocorticoid receptors on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in humans. *Endocrine* 43, 51-58, 10.1007/s12020-012-9750-8
26. Bernstein, D.P., Stein, J.A., Newcomb, M.D., Walker, E., Pogge, D., Ahluvalia, T., Stokes, J., Handelsman, L., Medrano, M., Desmond, D., Zule, W., 2003. Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. *Child abuse & neglect* 27, 169-190,
27. Berry, A., Bindocci, E., Alleva, E., 2012. NGF, brain and behavioral plasticity. *Neural plasticity* 2012, 784040, 10.1155/2012/784040
28. Bertaso, F., Roussignol, G., Worley, P., Bockaert, J., Fagni, L., Ango, F., 2010. Homer1a-Dependent Crosstalk Between NMDA and Metabotropic

- Glutamate Receptors in Mouse Neurons. *Plos One* 5, 10.1371/journal.pone.0009755
29. Bhattacharya, S.K., Ramchandani, S., Cervoni, N., Szyf, M., 1999. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397, 579-583,
 30. Biggio, F., Pisu, M.G., Garau, A., Boero, G., Locci, V., Mostallino, M.C., Olla, P., Utzeri, C., Serra, M., 2014. Maternal separation attenuates the effect of adolescent social isolation on HPA axis responsiveness in adult rats. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 24, 1152-1161, 10.1016/j.euroneuro.2014.03.009
 31. Biggio, F., Talani, G., Locci, V., Pisu, M.G., Boero, G., Ciarlo, B., Grayson, D.R., Serra, M., 2018. Low doses of prenatal ethanol exposure and maternal separation alter HPA axis function and ethanol consumption in adult male rats. *Neuropharmacology* 131, 271-281, 10.1016/j.neuropharm.2017.12.005
 32. Bilbo, S.D., Schwarz, J.M., 2012. The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Frontiers in neuroendocrinology* 33, 267-286, 10.1016/j.yfrne.2012.08.006
 33. Birey, F., Kloc, M., Chavali, M., Hussein, I., Wilson, M., Christoffel, D.J., Chen, T., Frohman, M.A., Robinson, J.K., Russo, S.J., Maffei, A., Aguirre, A., 2019. Genetic and Stress-Induced Loss of NG2 Glia Triggers Emergence of Depressive-like Behaviors through Reduced Secretion of FGF2. *Neuron* 104, 825-826, 10.1016/j.neuron.2019.11.005
 34. Bonapersona, V., Damsteegt, R., Adams, M.L., van Weert, L., Meijer, O.C., Joels, M., Sarabdjitsingh, R.A., 2019. Sex-Dependent Modulation of Acute Stress Reactivity After Early Life Stress in Mice: Relevance of Mineralocorticoid Receptor Expression. *Frontiers in behavioral neuroscience* 13, 181, 10.3389/fnbeh.2019.00181
 35. Bondar, N., Bryzgalov, L., Ershov, N., Gusev, F., Reshetnikov, V., Avgustinovich, D., Tenditnik, M., Rogaev, E., Merkulova, T., 2018a. Molecular Adaptations to Social Defeat Stress and Induced Depression in Mice. *Molecular neurobiology* 55, 3394-3407, 10.1007/s12035-017-0586-3
 36. Bondar, N.P., Lepeshko, A.A., Reshetnikov, V.V., 2018b. Effects of Early-Life Stress on Social and Anxiety-Like Behaviors in Adult Mice: Sex-Specific Effects. *Behav Neurol, Artn* 1538931
 37. 10.1155/2018/1538931

38. Bondar, N.P., Merkulova, T.I., 2016. Brain-derived neurotrophic factor and early-life stress: Multifaceted interplay. *Journal of biosciences* 41, 751-758, 10.1007/s12038-016-9648-3
39. Bonnert, T.P., McKernan, R.M., Farrar, S., le Bourdelles, B., Heavens, R.P., Smith, D.W., Hewson, L., Rigby, M.R., Sirinathsinghji, D.J., Brown, N., Wafford, K.A., Whiting, P.J., 1999. theta, a novel gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9891-9896, 10.1073/pnas.96.17.9891
40. Bordner, K.A., George, E.D., Carlyle, B.C., Duque, A., Kitchen, R.R., Lam, T.T., Colangelo, C.M., Stone, K.L., Abbott, T.B., Mane, S.M., Nairn, A.C., Simen, A.A., 2011. Functional genomic and proteomic analysis reveals disruption of myelin-related genes and translation in a mouse model of early life neglect. *Frontiers in psychiatry* 2, 18, 10.3389/fpsy.2011.00018
41. Brakeman, P.R., Lanahan, A.A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C.A., Huganir, R.L., Worley, P.F., 1997. Homer: A protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386, 284-288, Doi 10.1038/386284a0
42. Bredy, T.W., Humpartzoomian, R.A., Cain, D.P., Meaney, M.J., 2003. Partial reversal of the effect of maternal care on cognitive function through environmental enrichment. *Neuroscience* 118, 571-576,
43. Broggin, T., Schnell, L., Ghoochani, A., Mateos, J.M., Buchfelder, M., Wiendieck, K., Schafer, M.K., Eyupoglu, I.Y., Savaskan, N.E., 2016. Plasticity Related Gene 3 (PRG3) overcomes myelin-associated growth inhibition and promotes functional recovery after spinal cord injury. *Aging* 8, 2463-2487, 10.18632/aging.101066
44. Buonaguro, E.F., Morley-Fletcher, S., Avagliano, C., Vellucci, L., Iasevoli, F., Bouwalerh, H., Van Camp, G., Nicoletti, F., Maccari, S., de Bartolomeis, A., 2020. Glutamatergic postsynaptic density in early life stress programming: Topographic gene expression of mGlu5 receptors and Homer proteins. *Prog Neuro-Psychoph* 96, 10.1016/J.Pnpbp.2019.109725
45. Burke, N.N., Llorente, R., Marco, E.M., Tong, K., Finn, D.P., Viveros, M.P., Roche, M., 2013. Maternal Deprivation Is Associated With Sex-Dependent Alterations in Nociceptive Behavior and Neuroinflammatory Mediators in the Rat Following Peripheral Nerve Injury. *J Pain* 14, 1173-1184, 10.1016/j.jpain.2013.05.003

46. Burns, S.B., Almeida, D., Turecki, G., 2018. The Epigenetics of Early Life Adversity: Current Limitations and Possible Solutions. *Prog Mol Biol Transl* 157, 343-425, 10.1016/bs.pmbts.2018.01.008
47. Calabrese, F., van der Doelen, R.H., Guidotti, G., Racagni, G., Kozicz, T., Homberg, J.R., Riva, M.A., 2015. Exposure to early life stress regulates Bdnf expression in SERT mutant rats in an anatomically selective fashion. *Journal of neurochemistry* 132, 146-154, 10.1111/jnc.12846
48. Cao, P., Chen, C., Liu, A., Shan, Q., Zhu, X., Jia, C., Peng, X., Zhang, M., Farzinpour, Z., Zhou, W., Wang, H., Zhou, J.N., Song, X., Wang, L., Tao, W., Zheng, C., Zhang, Y., Ding, Y.Q., Jin, Y., Xu, L., Zhang, Z., 2021. Early-life inflammation promotes depressive symptoms in adolescence via microglial engulfment of dendritic spines. *Neuron* 109, 2573-2589 e2579, 10.1016/j.neuron.2021.06.012
49. Carbone, D.L., Handa, R.J., 2013. Sex and stress hormone influences on the expression and activity of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 239, 295-303, 10.1016/j.neuroscience.2012.10.073
50. Carlen, M., 2017. What constitutes the prefrontal cortex? *Science* 358, 478-482, 10.1126/science.aan8868
51. Carlyle, B.C., Duque, A., Kitchen, R.R., Bordner, K.A., Coman, D., Doolittle, E., Papademetris, X., Hyder, F., Taylor, J.R., Simen, A.A., 2012. Maternal separation with early weaning: a rodent model providing novel insights into neglect associated developmental deficits. *Development and psychopathology* 24, 1401-1416, 10.1017/S095457941200079X
52. Carr, C., Odell-Miller, H., Priebe, S., 2013. A systematic review of music therapy practice and outcomes with acute adult psychiatric in-patients. *PLoS one* 8, e70252, 10.1371/journal.pone.0070252
53. Carvalho Fernando, S., Beblo, T., Schlosser, N., Terfehr, K., Otte, C., Lowe, B., Wolf, O.T., Spitzer, C., Driessen, M., Wingenfeld, K., 2012. Associations of childhood trauma with hypothalamic-pituitary-adrenal function in borderline personality disorder and major depression. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1659-1668, 10.1016/j.psyneuen.2012.02.012
54. Champagne, D.L., Bagot, R.C., van Hasselt, F., Ramakers, G., Meaney, M.J., de Kloet, E.R., Joels, M., Krugers, H., 2008. Maternal care and hippocampal plasticity: Evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to

- glucocorticoids and stress. *Journal of Neuroscience* 28, 6037-6045, 10.1523/Jneurosci.0526-08.2008
55. Chaplin, A.B., Jones, P.B., Khandaker, G.M., 2020. Association between common early-childhood infection and subsequent depressive symptoms and psychotic experiences in adolescence: a population-based longitudinal birth cohort study. *Psychological medicine* 52, 1-11, 10.1017/S0033291720004080
56. Chapman, C.A., Nuwer, J.L., Jacob, T.C., 2022. The Yin and Yang of GABAergic and Glutamatergic Synaptic Plasticity: Opposites in Balance by Crosstalking Mechanisms. *Frontiers in synaptic neuroscience* 14, 911020, 10.3389/fnsyn.2022.911020
57. Chen, Y.C., Baram, T.Z., 2016. Toward Understanding How Early-Life Stress Reprograms Cognitive and Emotional Brain Networks. *Neuropsychopharmacology* 41, 197-206, 10.1038/npp.2015.181
58. Chocyk, A., Bobula, B., Dudys, D., Przyborowska, A., Majcher-Maslanka, I., Hess, G., Wedzony, K., 2013. Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *Eur J Neurosci* 38, 2089-2107, 10.1111/ejn.12208
59. Christiansen, G.B., Andersen, K.H., Riis, S., Nykjaer, A., Bolcho, U., Jensen, M.S., Holm, M.M., 2017. The sorting receptor SorCS3 is a stronger regulator of glutamate receptor functions compared to GABAergic mechanisms in the hippocampus. *Hippocampus* 27, 235-248, 10.1002/hipo.22689
60. Chrousos, G.P., 1995. Seminars in Medicine of the Beth-Israel-Hospital, Boston - the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation. *New Engl J Med* 332, 1351-1362, Doi 10.1056/Nejm199505183322008
61. Chrousos, G.P., 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nature reviews. Endocrinology* 5, 374-381, 10.1038/nrendo.2009.106
62. Churchman, L.S., Weissman, J.S., 2011. Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature* 469, 368-373, 10.1038/nature09652
63. Cingolani, L.A., Vitale, C., Dityatev, A., 2019. Intra- and Extracellular Pillars of a Unifying Framework for Homeostatic Plasticity: A Crosstalk

Between Metabotropic Receptors and Extracellular Matrix. *Frontiers in cellular neuroscience* 13, 10.3389/Fncel.2019.00513

64. Clifton, N.E., Trent, S., Thomas, K.L., Hall, J., 2019. Regulation and Function of Activity-Dependent Homer in Synaptic Plasticity. *Molecular neuropsychiatry* 5, 147-161, 10.1159/000500267
65. Collinson, N., Kuenzi, F.M., Jarolimek, W., Maubach, K.A., Cothliff, R., Sur, C., Smith, A., Otu, F.M., Howell, O., Atack, J.R., McKernan, R.M., Seabrook, G.R., Dawson, G.R., Whiting, P.J., Rosahl, T.W., 2002. Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 5572-5580, 10.1523/JNEUROSCI.22-13-05572.2002
66. Connor, C.M., Dincer, A., Straubhaar, J., Galler, J.R., Houston, I.B., Akbarian, S., 2012. Maternal immune activation alters behavior in adult offspring, with subtle changes in the cortical transcriptome and epigenome. *Schizophrenia research* 140, 175-184, 10.1016/j.schres.2012.06.037
67. Conti, B., Maier, R., Barr, A.M., Morale, M.C., Lu, X., Sanna, P.P., Bilbe, G., Hoyer, D., Bartfai, T., 2007. Region-specific transcriptional changes following the three antidepressant treatments electro convulsive therapy, sleep deprivation and fluoxetine. *Mol Psychiatr* 12, 167-189, 10.1038/sj.mp.4001897
68. Corbin, A., Mangili, G., Motta, M., Martini, L., 1965. Effect of Hypothalamic and Mesencephalic Steroid Implantations on Acth Feedback Mechanisms. *Endocrinology* 76, 811-818, 10.1210/endo-76-5-811
69. Costafreda, S.G., Brammer, M.J., David, A.S., Fu, C.H., 2008. Predictors of amygdala activation during the processing of emotional stimuli: a meta-analysis of 385 PET and fMRI studies. *Brain Res Rev* 58, 57-70, 10.1016/j.brainresrev.2007.10.012
70. Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M.R., Luthi, A., Kim, W.T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S.B., Flavell, R.A., McCormick, D.A., De Camilli, P., 1999. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99, 179-188, 10.1016/s0092-8674(00)81649-9
71. Dalle, M., Giry, J., Gay, M., Delost, P., 1978. Perinatal changes in plasma and adrenal corticosterone and aldosterone concentrations in the mouse. *The Journal of endocrinology* 76, 303-309,

72. Dandi, E., Kalamari, A., Touloumi, O., Lagoudaki, R., Nousiopoulou, E., Simeonidou, C., Spandou, E., Tata, D.A., 2018. Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 67, 19-32, 10.1016/j.ijdevneu.2018.03.003
73. Daskalakis, N.P., Claessens, S.E.F., Laboyrie, J.J.L., Enthoven, L., Oitzl, M.S., Champagne, D.L., de Kloet, E.R., 2011. The newborn rat's stress system readily habituates to repeated and prolonged maternal separation, while continuing to respond to stressors in context dependent fashion. *Horm Behav* 60, 165-176, 10.1016/j.yhbeh.2011.04.003
74. De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Joels, M., 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine reviews* 19, 269-301, 10.1210/edrv.19.3.0331
75. Deng, A., Irizarry, M.C., Nitsch, R.M., Growdon, J.H., Rebeck, G.W., 2001. Elevation of cystatin C in susceptible neurons in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 159, 1061-1068, 10.1016/S0002-9440(10)61781-6
76. Dent, G.W., Okimoto, D.K., Smith, M.A., Levine, S., 2000. Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. *Neuroendocrinology* 71, 333-342, 10.1159/000054554
77. Dere, E., Huston, J.P., De Souza Silva, M.A., 2007. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 31, 673-704, 10.1016/j.neubiorev.2007.01.005
78. Dickson, D.A., Paulus, J.K., Mensah, V., Lem, J., Saavedra-Rodriguez, L., Gentry, A., Pagidas, K., Feig, L.A., 2018. Reduced levels of miRNAs 449 and 34 in sperm of mice and men exposed to early life stress. *Translational psychiatry* 8, 101, 10.1038/s41398-018-0146-2
79. Diering, G.H., Nirujogi, R.S., Roth, R.H., Worley, P.F., Pandey, A., Hugarir, R.L., 2017. Homer1a drives homeostatic scaling-down of excitatory synapses during sleep. *Science* 355, 511-+, 10.1126/science.aai8355

80. Dixon, M.L., Thiruchselvam, R., Todd, R., Christoff, K., 2017. Emotion and the Prefrontal Cortex: An Integrative Review. *Psychol Bull* 143, 1033-1081, 10.1037/bul0000096
81. Dube, S.R., Anda, R.F., Felitti, V.J., Chapman, D.P., Williamson, D.F., Giles, W.H., 2001. Childhood abuse, household dysfunction, and the risk of attempted suicide throughout the life span: findings from the Adverse Childhood Experiences Study. *Jama* 286, 3089-3096,
82. Dupouy, J.P., Coffigny, H., Magre, S., 1975. Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *The Journal of endocrinology* 65, 347-352,
83. Eldridge, J.C., Fleenor, D.G., Kerr, D.S., Landfield, P.W., 1989. Impaired up-regulation of type II corticosteroid receptors in hippocampus of aged rats. *Brain Res* 478, 248-256,
84. Ellenbroek, B.A., Cools, A.R., 2002. Early maternal deprivation and prepulse inhibition - The role of the postdeprivation environment. *Pharmacol Biochem Be* 73, 177-184, Pii S0091-3057(02)00794-3
85. Doi 10.1016/S0091-3057(02)00794-3
86. Englund, J., Haikonen, J., Shteinikov, V., Amarilla, S.P., Atanasova, T., Shintyapina, A., Ryazantseva, M., Partanen, J., Voikar, V., Lauri, S.E., 2021. Downregulation of kainate receptors regulating GABAergic transmission in amygdala after early life stress is associated with anxiety-like behavior in rodents. *Translational psychiatry* 11, 538, 10.1038/s41398-021-01654-7
87. Enthoven, L., Oitzl, M.S., Koning, N., van der Mark, M., de Kloet, E.R., 2008. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of newborn mice rapidly desensitizes to repeated maternal absence but becomes highly responsive to novelty. *Endocrinology* 149, 6366-6377, 10.1210/en.2008-0238
88. Ershov, N.I., Bondar, N.P., Lepeshko, A.A., Reshetnikov, V.V., Ryabushkina, J.A., Merkulova, T.I., 2018. Consequences of early life stress on genomic landscape of H3K4me3 in prefrontal cortex of adult mice. *BMC genomics* 19, 93, 10.1186/s12864-018-4479-2
89. Euston, D.R., Gruber, A.J., McNaughton, B.L., 2012. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron* 76, 1057-1070, 10.1016/j.neuron.2012.12.002
90. Evans, G.W., Kim, P., 2013. Childhood Poverty, Chronic Stress, Self-Regulation, and Coping. *Child Dev Perspect* 7, 43-48, 10.1111/cdep.12013

91. Fedorenko, O., Strutz-Seebohm, N., Henrion, U., Ureche, O.N., Lang, F., Seebohm, G., Lang, U.E., 2008. A schizophrenia-linked mutation in PIP5K2A fails to activate neuronal M channels. *Psychopharmacology* 199, 47-54, 10.1007/s00213-008-1095-x
92. Fei, F., Rao, W., Zhang, L., Chen, B.G., Li, J., Fei, Z., Chen, Z., 2014. Downregulation of Homer1b/C Improves Neuronal Survival after Traumatic Neuronal Injury. *Neuroscience* 267, 187-194, 10.1016/j.neuroscience.2014.02.037
93. Feng, J., Wilkinson, M., Liu, X., Purushothaman, I., Ferguson, D., Vialou, V., Maze, I., Shao, N., Kennedy, P., Koo, J., Dias, C., Laitman, B., Stockman, V., LaPlant, Q., Cahill, M.E., Nestler, E.J., Shen, L., 2014. Chronic cocaine-regulated epigenomic changes in mouse nucleus accumbens. *Genome biology* 15, R65, 10.1186/gb-2014-15-4-r65
94. Fenoglio, K.A., Brunson, K.L., Avishai-Eliner, S., Stone, B.A., Kapadia, B.J., Baram, T.Z., 2005. Enduring, handling-evoked enhancement of hippocampal memory function and glucocorticoid receptor expression involves activation of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor. *Endocrinology* 146, 4090-4096, 10.1210/en.2004-1285
95. Fields, R.D., Bukalo, O., 2020. Myelin makes memories. *Nature neuroscience* 23, 469-470, 10.1038/s41593-020-0606-x
96. Flandreau, E.I., Toth, M., 2018. Animal Models of PTSD: A Critical Review. *Current topics in behavioral neurosciences* 38, 47-68, 10.1007/7854_2016_65
97. Flavell, S.W., Kim, T.K., Gray, J.M., Harmin, D.A., Hemberg, M., Hong, E.J., Markenscoff-Papadimitriou, E., Bear, D.M., Greenberg, M.E., 2008. Genome-wide analysis of MEF2 transcriptional program reveals synaptic target genes and neuronal activity-dependent polyadenylation site selection. *Neuron* 60, 1022-1038, 10.1016/j.neuron.2008.11.029
98. Fonzo, G.A., Ramsawh, H.J., Flagan, T.M., Simmons, A.N., Sullivan, S.G., Allard, C.B., Paulus, M.P., Stein, M.B., 2016. Early life stress and the anxious brain: evidence for a neural mechanism linking childhood emotional maltreatment to anxiety in adulthood. *Psychol Med* 46, 1037-1054, 10.1017/S0033291715002603
99. Frairia, R., Agrimonti, F., Fortunati, N., Fazzari, A., Gennari, P., Berta, L., 1988. Influence of Naturally-Occurring and Synthetic Glucocorticoids on Corticosteroid-Binding Globulin-Steroid Interaction in Human Peripheral

- Plasma. *Ann Ny Acad Sci* 538, 287-303, DOI 10.1111/j.1749-6632.1988.tb48873.x
100. Francesconi, A., Kumari, R., Zukin, R.S., 2009. Proteomic analysis reveals novel binding partners of metabotropic glutamate receptor 1. *Journal of neurochemistry* 108, 1515-1525, 10.1111/j.1471-4159.2009.05913.x
 101. Friard, O., Gamba, M., 2016. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution* 7, 1325-1330, 10.1111/2041-210X.12584
 102. Friard O., G.M., 2016. BORIS: A free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution* 7, 1325–1330, 10.1111/2041-210X.12584
 103. Fuentes, I.M., Pierce, A.N., Di Silvestro, E.R., Maloney, M.O., Christianson, J.A., 2017. Differential Influence of Early Life and Adult Stress on Urogenital Sensitivity and Function in Male Mice. *Frontiers in systems neuroscience* 11, 97, 10.3389/fnsys.2017.00097
 104. Furube, E., Kawai, S., Inagaki, H., Takagi, S., Miyata, S., 2018. Brain Region-dependent Heterogeneity and Dose-dependent Difference in Transient Microglia Population Increase during Lipopolysaccharide-induced Inflammation. *Scientific reports* 8, 2203, 10.1038/s41598-018-20643-3
 105. Fusar-Poli, P., Placentino, A., Carletti, F., Landi, P., Allen, P., Surguladze, S., Benedetti, F., Abbamonte, M., Gasparotti, R., Barale, F., Perez, J., McGuire, P., Politi, P., 2009. Functional atlas of emotional faces processing: a voxel-based meta-analysis of 105 functional magnetic resonance imaging studies. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 34, 418-432,
 106. Fuxe, K., Harfstrand, A., Agnati, L.F., Yu, Z.Y., Cintra, A., Wikstrom, A.C., Okret, S., Cantoni, E., Gustafsson, J.A., 1985. Immunocytochemical Studies on the Localization of Glucocorticoid Receptor Immunoreactive Nerve-Cells in the Lower Brain-Stem and Spinal-Cord of the Male-Rat Using a Monoclonal-Antibody against Rat-Liver Glucocorticoid Receptor. *Neuroscience Letters* 60, 1-6, Doi 10.1016/0304-3940(85)90372-6
 107. Galigniana, M.D., Erlejman, A.G., Monte, M., Gomez-Sanchez, C., Piwien-Pilipuk, G., 2010. The hsp90-FKBP52 Complex Links the Mineralocorticoid Receptor to Motor Proteins and Persists Bound to the

- Receptor in Early Nuclear Events. *Mol Cell Biol* 30, 1285-1298, 10.1128/Mcb.01190-09
108. Ganong, B.R., 1991. Roles of Lipid Turnover in Transmembrane Signal Transduction. *Am J Med Sci* 302, 304-312, Doi 10.1097/00000441-199111000-00009
 109. Gapp, K., Bohacek, J., Grossmann, J., Brunner, A.M., Manuella, F., Nanni, P., Mansuy, I.M., 2016. Potential of Environmental Enrichment to Prevent Transgenerational Effects of Paternal Trauma. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 41, 2749-2758, 10.1038/npp.2016.87
 110. Garbern, J.Y., Yool, D.A., Moore, G.J., Wilds, I.B., Faulk, M.W., Klugmann, M., Nave, K.A., Siermans, E.A., van der Knaap, M.S., Bird, T.D., Shy, M.E., Kamholz, J.A., Griffiths, I.R., 2002. Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation. *Brain : a journal of neurology* 125, 551-561, 10.1093/brain/awf043
 111. Gartside, S.E., Johnson, D.A., Leitch, M.M., Troakes, C., Ingram, C.D., 2003. Early life adversity programs changes in central 5-HT neuronal function in adulthood. *Eur J Neurosci* 17, 2401-2408, 10.1046/j.1460-9568.2003.02668.x
 112. Gauthier, S., Kaur, G., Mi, W., Tizon, B., Levy, E., 2011. Protective mechanisms by cystatin C in neurodegenerative diseases. *Front Biosci (Schol Ed)* 3, 541-554, 10.2741/s170
 113. Germain, A., Kupfer, D.J., 2008. Circadian rhythm disturbances in depression. *Human psychopharmacology* 23, 571-585, 10.1002/hup.964
 114. Giedd, J.N., Snell, J.W., Lange, N., Rajapakse, J.C., Casey, B.J., Kozuch, P.L., Vaituzis, A.C., Vauss, Y.C., Hamburger, S.D., Kaysen, D., Rapoport, J.L., 1996. Quantitative magnetic resonance imaging of human brain development: ages 4-18. *Cereb Cortex* 6, 551-560,
 115. Golden, S.A., Covington, H.E., 3rd, Berton, O., Russo, S.J., 2011. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature protocols* 6, 1183-1191, 10.1038/nprot.2011.361
 116. Goldman, L., Winget, C., Hollingshead, G.W., Levine, S., 1973. Postweaning development of negative feedback in the pituitary-adrenal system of the rat. *Neuroendocrinology* 12, 199-211, 10.1159/000122169

117. Gondre-Lewis, M.C., Warnock, K.T., Wang, H., June, H.L., Jr., Bell, K.A., Rabe, H., Tiruveedhula, V.V., Cook, J., Luddens, H., Aurelian, L., June, H.L., Sr., 2016. Early life stress is a risk factor for excessive alcohol drinking and impulsivity in adults and is mediated via a CRF/GABA(A) mechanism. *Stress* 19, 235-247, 10.3109/10253890.2016.1160280
118. Gonzalez, D.M., Gregory, J., Brennand, K.J., 2017. The Importance of Non-neuronal Cell Types in hiPSC-Based Disease Modeling and Drug Screening. *Frontiers in cell and developmental biology* 5, 117, 10.3389/fcell.2017.00117
119. Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., Young, R.A., 2007. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88, 10.1016/j.cell.2007.05.042
120. Guidotti, G., Calabrese, F., Anacker, C., Racagni, G., Pariante, C.M., Riva, M.A., 2013. Glucocorticoid Receptor and FKBP5 Expression Is Altered Following Exposure to Chronic Stress: Modulation by Antidepressant Treatment. *Neuropsychopharmacology* 38, 616-627, 10.1038/npp.2012.225
121. Gunnar, M.R., Frenn, K., Wewerka, S.S., Van Ryzin, M.J., 2009. Moderate versus severe early life stress: associations with stress reactivity and regulation in 10-12-year-old children. *Psychoneuroendocrinology* 34, 62-75, 10.1016/j.psyneuen.2008.08.013
122. Gururajan, A., 2022. The impact of chronic stress on the PFC transcriptome: a bioinformatic meta-analysis of publicly available RNA-sequencing datasets. *Stress* 25, 305-312, 10.1080/10253890.2022.2111211
123. Hakamata, Y., Suzuki, Y., Kobashikawa, H., Hori, H., 2022. Neurobiology of early life adversity: A systematic review of meta-analyses towards an integrative account of its neurobiological trajectories to mental disorders. *Frontiers in neuroendocrinology* 65, 100994, 10.1016/j.yfrne.2022.100994
124. Hammond, G.L., Smith, C.L., Underhill, C.M., Nguyen, V.T.T., 1990. Interaction between Corticosteroid Binding Globulin and Activated Leukocytes In vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 172, 172-177, Doi 10.1016/S0006-291x(05)80189-5
125. Hanson, J.L., Knodt, A.R., Brigidi, B.D., Hariri, A.R., 2015. Lower structural integrity of the uncinate fasciculus is associated with a history of child maltreatment and future psychological vulnerability to stress.

- Development and psychopathology 27, 1611-1619,
10.1017/S0954579415000978
126. Hayashi, M.K., Tang, C.Y., Verpelli, C., Narayanan, R., Stearns, M.H., Xu, R.M., Li, H.L., Sala, C., Hayashi, Y., 2009. The Postsynaptic Density Proteins Homer and Shank Form a Polymeric Network Structure. *Cell* 137, 159-171, 10.1016/j.cell.2009.01.050
 127. Heim, C., Newport, D.J., Mletzko, T., Miller, A.H., Hemeroff, C.B., 2008. The link between childhood trauma and depression: Insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology* 33, 693-710, 10.1016/j.psyneuen.2008.03.008
 128. Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K.A., Wang, W., Weng, Z., Green, R.D., Crawford, G.E., Ren, B., 2007. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature genetics* 39, 311-318, 10.1038/ng1966
 129. Howard, D.M., Adams, M.J., Clarke, T.K., Hafferty, J.D., Gibson, J., Shirali, M., Coleman, J.R.I., Hagenaaars, S.P., Ward, J., Wigmore, E.M., Alloza, C., Shen, X., Barbu, M.C., Xu, E.Y., Whalley, H.C., Marioni, R.E., Porteous, D.J., Davies, G., Deary, I.J., Hemani, G., Berger, K., Teismann, H., Rawal, R., Arolt, V., Baune, B.T., Dannlowski, U., Domschke, K., Tian, C., Hinds, D.A., Trzaskowski, M., Byrne, E.M., Ripke, S., Smith, D.J., Sullivan, P.F., Wray, N.R., Breen, G., Lewis, C.M., McIntosh, A.M., 2019. Genome-wide meta-analysis of depression identifies 102 independent variants and highlights the importance of the prefrontal brain regions. *Nature neuroscience* 22, 343-352, 10.1038/s41593-018-0326-7
 130. Howe, F.S., Fischl, H., Murray, S.C., Mellor, J., 2017. Is H3K4me3 instructive for transcription activation? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 39, 1-12, 10.1002/bies.201600095
 131. Hsiao, Y.M., Tsai, T.C., Lin, Y.T., Chen, C.C., Huang, C.C., Hsu, K.S., 2016. Early life stress dampens stress responsiveness in adolescence: Evaluation of neuroendocrine reactivity and coping behavior. *Psychoneuroendocrinology* 67, 86-99, 10.1016/j.psyneuen.2016.02.004
 132. Hsu, F.C., Zhang, G.J., Raol, Y.S., Valentino, R.J., Coulter, D.A., Brooks-Kayal, A.R., 2003. Repeated neonatal handling with maternal separation permanently alters hippocampal GABAA receptors and behavioral stress responses. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America 100, 12213-12218, 10.1073/pnas.2131679100
133. Hu, J.H., Park, J.M., Park, S., Xiao, B., Dehoff, M.H., Kim, S., Hayashi, T., Schwarz, M.K., Haganir, R.L., Seeburg, P.H., Linden, D.J., Worley, P.F., 2010. Homeostatic Scaling Requires Group I mGluR Activation Mediated by Homer1a. *Neuron* 68, 1128-1142, 10.1016/j.neuron.2010.11.008
 134. Huang, H.S., Matevossian, A., Jiang, Y., Akbarian, S., 2006. Chromatin immunoprecipitation in postmortem brain. *Journal of neuroscience methods* 156, 284-292, 10.1016/j.jneumeth.2006.02.018
 135. Huot, R.L., Plotsky, P.M., Lenox, R.H., McNamara, R.K., 2002. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res* 950, 52-63, Pii S0006-8993(02)02985-2
 136. Doi 10.1016/S0006-8993(02)02985-2
 137. Ibi, D., Nitta, A., Ishige, K., Cen, X., Ohtakara, T., Nabeshima, T., Ito, Y., 2010. Piccolo knockdown-induced impairments of spatial learning and long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neurochemistry international* 56, 77-83, 10.1016/j.neuint.2009.09.004
 138. Irwin, M.R., Cole, S.W., 2011. Reciprocal regulation of the neural and innate immune systems. *Nature reviews. Immunology* 11, 625-632, 10.1038/nri3042
 139. Jackson, V.A., del Toro, D., Carrasquero, M., Roversi, P., Harlos, K., Klein, R., Seiradake, E., 2015. Structural basis of latrophilin-FLRT interaction. *Structure* 23, 774-781, 10.1016/j.str.2015.01.013
 140. Jacobson, L., Sapolsky, R., 1991. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine reviews* 12, 118-134, 10.1210/edrv-12-2-118
 141. Jain, N., Lim, L.W., Tan, W.T., George, B., Makeyev, E., Thanabalu, T., 2014. Conditional N-WASP knockout in mouse brain implicates actin cytoskeleton regulation in hydrocephalus pathology. *Experimental neurology* 254, 29-40, 10.1016/j.expneurol.2014.01.011
 142. Jeanneteau, F., Chao, M.V., 2013. Are BDNF and glucocorticoid activities calibrated? *Neuroscience* 239, 173-195, 10.1016/j.neuroscience.2012.09.017

143. Jones, O.D., 2017. Do group I metabotropic glutamate receptors mediate LTD? *Neurobiol Learn Mem* 138, 85-97, 10.1016/j.nlm.2016.08.010
144. Joo, Y., Choi, K.M., Lee, Y.H., Kim, G., Lee, D.H., Roh, G.S., Kang, S.S., Cho, G.J., Choi, W.S., Kim, H.J., 2009. Chronic immobilization stress induces anxiety- and depression-like behaviors and decreases transthyretin in the mouse cortex. *Neuroscience letters* 461, 121-125, 10.1016/j.neulet.2009.06.025
145. Kandaswamy, R., McQuillin, A., Sharp, S.I., Fiorentino, A., Anjorin, A., Blizard, R.A., Curtis, D., Gurling, H.M., 2013. Genetic association, mutation screening, and functional analysis of a Kozak sequence variant in the metabotropic glutamate receptor 3 gene in bipolar disorder. *JAMA psychiatry* 70, 591-598, 10.1001/jamapsychiatry.2013.38
146. Kapoor, A., Petropoulos, S., Matthews, S.G., 2008. Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. *Brain Res Rev* 57, 586-595, 10.1016/j.brainresrev.2007.06.013
147. Kember, R.L., Dempster, E.L., Lee, T.H., Schalkwyk, L.C., Mill, J., Fernandes, C., 2012a. Maternal separation is associated with strain-specific responses to stress and epigenetic alterations to *Nr3c1*, *Avp*, and *Nr4a1* in mouse. *Brain and behavior* 2, 455-467, 10.1002/brb3.69
148. Kember, R.L., Dempster, E.L., Lee, T.H.A., Schalkwyk, L.C., Mill, J., Fernandes, C., 2012b. Maternal separation is associated with strain-specific responses to stress and epigenetic alterations to *Nr3c1*, *Avp*, and *Nr4a1* in mouse. *Brain Behav* 2, 455-467, 10.1002/brb3.69
149. Kessels, H.W., Malinow, R., 2009. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* 61, 340-350, 10.1016/j.neuron.2009.01.015
150. Kessler, R.C., McLaughlin, K.A., Green, J.G., Gruber, M.J., Sampson, N.A., Zaslavsky, A.M., Aguilar-Gaxiola, S., Alhamzawi, A.O., Alonso, J., Angermeyer, M., Benjet, C., Bromet, E., Chatterji, S., de Girolamo, G., Demyttenaere, K., Fayyad, J., Florescu, S., Gal, G., Gureje, O., Haro, J.M., Hu, C.Y., Karam, E.G., Kawakami, N., Lee, S., Lepine, J.P., Ormel, J., Posada-Villa, J., Sagar, R., Tsang, A., Ustun, T.B., Vassilev, S., Viana, M.C., Williams, D.R., 2010. Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO World Mental Health Surveys. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 197, 378-385, 10.1192/bjp.bp.110.080499

151. Khandaker, G.M., Stochl, J., Zammit, S., Lewis, G., Jones, P.B., 2014. Childhood Epstein-Barr Virus infection and subsequent risk of psychotic experiences in adolescence: a population-based prospective serological study. *Schizophrenia research* 158, 19-24, 10.1016/j.schres.2014.05.019
152. Khantakova, J.N., Bondar, N.P., Saprionova, A.A., Reshetnikov, V.V., 2022. Delayed effects of neonatal immune activation on brain neurochemistry and hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning. *The European journal of neuroscience* 56, 5931-5951, 10.1111/ejn.15831
153. Khare, S.P., Habib, F., Sharma, R., Gadewal, N., Gupta, S., Galande, S., 2012. Histome-a relational knowledgebase of human histone proteins and histone modifying enzymes. *Nucleic Acids Res* 40, D337-D342, 10.1093/nar/gkr1125
154. Kim, P., Evans, G.W., Angstadt, M., Ho, S.S., Sripada, C.S., Swain, J.E., Liberzon, I., Phan, K.L., 2013. Effects of childhood poverty and chronic stress on emotion regulatory brain function in adulthood. *P Natl Acad Sci USA* 110, 18442-18447, 10.1073/pnas.1308240110
155. Korolenko, T.A., A.B. Shintyapina, V.M. Belichenko, A.B. Pupyshev, A.A. Akopyan, L.A. Fedoseeva, G.S. Russkikh, V.A. Vavilin, M.V. Tenditnik, C.-L. Lin, T.G. Amstislavskaya, M.A. Tikhonova, 2020. Early Parkinson's Disease-Like Pathology in a Transgenic Mouse Model Involves a Decreased Cst3 mRNA Expression But Not Neuroinflammatory Response in the Brain. *Medical University* 3(2):66-78,
156. Korosi, A., Shanabrough, M., McClelland, S., Liu, Z.W., Borok, E., Gao, X.B., Horvath, T.L., Baram, T.Z., 2010. Early-life experience reduces excitation to stress-responsive hypothalamic neurons and reprograms the expression of corticotropin-releasing hormone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 703-713, 10.1523/JNEUROSCI.4214-09.2010
157. Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705, 10.1016/j.cell.2007.02.005
158. Kuang, Z., Cai, L., Zhang, X., Ji, H., Tu, B.P., Boeke, J.D., 2014. High-temporal-resolution view of transcription and chromatin states across distinct metabolic states in budding yeast. *Nature structural & molecular biology* 21, 854-863, 10.1038/nsmb.2881

159. Kudryavtseva, N.N., Bakshtanovskaya, I.V., Koryakina, L.A., 1991. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacol Biochem Behav* 38, 315-320,
160. Kulikov, A.V., Tikhonova, M.A., Kulikov, V.A., 2008a. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting. *Journal of neuroscience methods* 170, 345-351, 10.1016/j.jneumeth.2008.01.024
161. Kulikov, A.V., Tikhonova, M.A., Kulikov, V.A., 2008b. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting. *Journal of Neuroscience Methods* 170, 345-351, 10.1016/j.jneumeth.2008.01.024
162. Kundakovic, M., Lim, S., Gudsnuk, K., Champagne, F.A., 2013. Sex-specific and strain-dependent effects of early life adversity on behavioral and epigenetic outcomes. *Frontiers in psychiatry* 4, 78, 10.3389/fpsy.2013.00078
163. Ladd, C.O., Huot, R.L., Thrivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Plotsky, P.M., 2004. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biological psychiatry* 55, 367-375, 10.1016/j.biopsych.2003.10.007
164. Ladd, C.O., Thrivikraman, K.V., Huot, R.L., Plotsky, P.M., 2005. Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology* 30, 520-533, 10.1016/j.psyneuen.2004.12.004
165. Lainiola, M., Procaccini, C., Linden, A.M., 2014. mGluR3 knockout mice show a working memory defect and an enhanced response to MK-801 in the T- and Y-maze cognitive tests. *Behavioural brain research* 266, 94-103, 10.1016/j.bbr.2014.03.008
166. Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutierrez-Ospina, G., Torner, L., 2012. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology* 37, 410-420, 10.1016/j.psyneuen.2011.07.011
167. Landgraf, D., McCarthy, M.J., Welsh, D.K., 2014. Circadian clock and stress interactions in the molecular biology of psychiatric disorders. *Current psychiatry reports* 16, 483, 10.1007/s11920-014-0483-7

168. Landt, S.G., Marinov, G.K., Kundaje, A., Kheradpour, P., Pauli, F., Batzoglou, S., Bernstein, B.E., Bickel, P., Brown, J.B., Cayting, P., Chen, Y., DeSalvo, G., Epstein, C., Fisher-Aylor, K.I., Euskirchen, G., Gerstein, M., Gertz, J., Hartemink, A.J., Hoffman, M.M., Iyer, V.R., Jung, Y.L., Karmakar, S., Kellis, M., Kharchenko, P.V., Li, Q., Liu, T., Liu, X.S., Ma, L., Milosavljevic, A., Myers, R.M., Park, P.J., Pazin, M.J., Perry, M.D., Raha, D., Reddy, T.E., Rozowsky, J., Shores, N., Sidow, A., Slattery, M., Stamatoyannopoulos, J.A., Tolstorukov, M.Y., White, K.P., Xi, S., Farnham, P.J., Lieb, J.D., Wold, B.J., Snyder, M., 2012. ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome research* 22, 1813-1831, 10.1101/gr.136184.111
169. Laubach, Z.M., Greenberg, J.R., Turner, J.W., Montgomery, T.M., Pioon, M.O., Sawdy, M.A., Smale, L., Cavalcante, R.G., Padmanabhan, K.R., Lalancette, C., vonHoldt, B., Faulk, C.D., Dolinoy, D.C., Holekamp, K.E., Perng, W., 2021. Early-life social experience affects offspring DNA methylation and later life stress phenotype. *Nature communications* 12, 4398, 10.1038/s41467-021-24583-x
170. Leachman, N.T., Brellier, F., Ferralli, J., Chiquet-Ehrismann, R., Tucker, R.P., 2010. ATAD2B is a phylogenetically conserved nuclear protein expressed during neuronal differentiation and tumorigenesis. *Development, growth & differentiation* 52, 747-755, 10.1111/j.1440-169X.2010.01211.x
171. LeDoux, J., 2012. Rethinking the emotional brain. *Neuron* 73, 653-676, 10.1016/j.neuron.2012.02.004
172. Lehmann, M.L., Weigel, T.K., Elkahloun, A.G., Herkenham, M., 2017. Chronic social defeat reduces myelination in the mouse medial prefrontal cortex. *Scientific reports* 7, 46548, 10.1038/srep46548
173. LeMoult, J., Humphreys, K.L., Tracy, A., Hoffmeister, J.A., Ip, E., Gotlib, I.H., 2020. Meta-analysis: Exposure to Early Life Stress and Risk for Depression in Childhood and Adolescence. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 59, 842-855, 10.1016/j.jaac.2019.10.011
174. Levine, A., Worrell, T.R., Zimnisky, R., Schmauss, C., 2012. Early life stress triggers sustained changes in histone deacetylase expression and histone H4 modifications that alter responsiveness to adolescent antidepressant treatment. *Neurobiol Dis* 45, 488-498, 10.1016/j.nbd.2011.09.005

175. Levine, S., 1957. Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science* 126, 405,
176. Levine, S., Huchton, D.M., Wiener, S.G., Rosenfeld, P., 1991. Time Course of the Effect of Maternal-Deprivation on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the Infant Rat. *Developmental Psychobiology* 24, 547-558, DOI 10.1002/dev.420240803
177. Li, F., Lu, J.Y., Liu, Q., Wang, H.W., Guo, H., 2013. Altered MARCH1 ubiquitination-regulated dendritic cell immune functions during the early stage of zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in mice. *Immunology letters* 150, 105-115, 10.1016/j.imlet.2012.12.012
178. Li, M., Fu, X., Xie, W., Guo, W., Li, B., Cui, R., Yang, W., 2020. Effect of Early Life Stress on the Epigenetic Profiles in Depression. *Frontiers in cell and developmental biology* 8, 867, 10.3389/fcell.2020.00867
179. Li, M.X., Li, Q., Sun, X.J., Luo, C., Li, Y., Wang, Y.N., Chen, J., Gong, C.Z., Li, Y.J., Shi, L.P., Zheng, Y.F., Li, R.C., Huang, X.L., Xiong, Q.J., Chen, H., 2019. Increased Homer1-mGluR5 mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors and glutamatergic dysregulation via activation of PERK-eIF2alpha. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 95, 109682, 10.1016/j.pnpbp.2019.109682
180. Liang, M., Zhong, H., Rong, J., Li, Y., Zhu, C., Zhou, L., Zhou, R., 2019. Postnatal Lipopolysaccharide Exposure Impairs Adult Neurogenesis and Causes Depression-like Behaviors Through Astrocytes Activation Triggering GABAA Receptor Downregulation. *Neuroscience* 422, 21-31, 10.1016/j.neuroscience.2019.10.025
181. Lippmann, M., Bress, A., Nemeroff, C.B., Plotsky, P.M., Monteggia, L.M., 2007a. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur J Neurosci* 25, 3091-3098, 10.1111/j.1460-9568.2007.05522.x
182. Lippmann, M., Bress, A., Nemeroff, C.B., Plotsky, P.M., Monteggia, L.M., 2007b. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *European Journal of Neuroscience* 25, 3091-3098, 10.1111/j.1460-9568.2007.05522.x
183. Liu, D., Diorio, J., Day, J.C., Francis, D.D., Meaney, M.J., 2000a. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature Neuroscience* 3, 799-806,

184. Liu, D., Diorio, J., Day, J.C., Francis, D.D., Meaney, M.J., 2000b. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature neuroscience* 3, 799-806, 10.1038/77702
185. Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277, 1659-1662,
186. Liu, J., Dietz, K., Hodes, G.E., Russo, S.J., Casaccia, P., 2018. Widespread transcriptional alternations in oligodendrocytes in the adult mouse brain following chronic stress. *Developmental neurobiology* 78, 152-162, 10.1002/dneu.22533
187. Liu, Y.W., Liu, W.H., Wu, C.C., Juan, Y.C., Wu, Y.C., Tsai, H.P., Wang, S., Tsai, Y.C., 2016. Psychotropic effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 in early life-stressed and naive adult mice. *Brain research* 1631, 1-12, 10.1016/j.brainres.2015.11.018
188. Llorente-Berzal, A., Fuentes, S., Gagliano, H., Lopez-Gallardo, M., Armario, A., Viveros, M.P., Nadal, R., 2011. Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. *Addict Biol* 16, 624-637, 10.1111/j.1369-1600.2011.00318.x
189. Llorente, R., Arranz, L., Marco, E.M., Moreno, E., Puerto, M., Guaza, C., De la Fuente, M., Viveros, M.P., 2007. Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology* 32, 636-650, 10.1016/j.psyneuen.2007.04.002
190. Loi, M., Mossink, J.C., Meerhoff, G.F., Den Blaauwen, J.L., Lucassen, P.J., Joels, M., 2017. Effects of early-life stress on cognitive function and hippocampal structure in female rodents. *Neuroscience* 342, 101-119, 10.1016/j.neuroscience.2015.08.024
191. Lominac, K.D., Oleson, E.B., Pava, M., Klugmann, M., Schwarz, M.K., Seeburg, P.H., During, M.J., Worley, P.F., Kalivas, P.W., Szumlanski, K.K., 2005. Distinct roles for different Homer1 isoforms in behaviors and associated prefrontal cortex function. *Journal of Neuroscience* 25, 11586-11594, 10.1523/Jneurosci.3764-05.2005
192. Lu, J., Gong, X., Yao, X., Guang, Y., Yang, H., Ji, R., He, Y., Zhou, W., Wang, H., Wang, W., Bai, S., Guo, H., Guo, Z.V., Xie, P., 2021. Prolonged chronic social defeat stress promotes less resilience and higher uniformity in depression-like behaviors in adult male mice. *Biochemical and*

- biophysical research communications 553, 107-113,
10.1016/j.bbrc.2021.03.058
193. Lu, Y., Christian, K., Lu, B., 2008. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiology of learning and memory* 89, 312-323, 10.1016/j.nlm.2007.08.018
 194. Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., Heim, C., 2009a. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature reviews. Neuroscience* 10, 434-445, 10.1038/nrn2639
 195. Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., Heim, C., 2009b. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10, 434-445, 10.1038/nrn2639
 196. Lyons, D.M., Parker, K.J., Schatzberg, A.F., 2010. Animal Models of Early Life Stress: Implications for Understanding Resilience. *Dev Psychobiol* 52, 616-624, 10.1002/dev.20500
 197. Lyons, M.R., West, A.E., 2011. Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Progress in neurobiology* 94, 259-295, 10.1016/j.pneurobio.2011.05.003
 198. Macri, S., Chiarotti, F., Wurbel, H., 2008. Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behav Brain Res* 191, 227-234, 10.1016/j.bbr.2008.03.031
 199. Mahan, A.L., Mou, L., Shah, N., Hu, J.H., Worley, P.F., Ressler, K.J., 2012. Epigenetic modulation of Homer1a transcription regulation in amygdala and hippocampus with pavlovian fear conditioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 4651-4659, 10.1523/JNEUROSCI.3308-11.2012
 200. Maniam, J., Morris, M.J., 2010. Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology* 35, 717-728, 10.1016/j.psyneuen.2009.10.013
 201. Marco, E.M., Adriani, W., Canese, R., Podo, F., Viveros, M.P., Laviola, G., 2007. Enhancement of endocannabinoid signalling during adolescence: Modulation of impulsivity and long-term consequences on metabolic brain parameters in early maternally deprived rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 86, 334-345, 10.1016/j.pbb.2006.10.006

202. Marco, E.M., Llorente, R., Lopez-Gallardo, M., Mela, V., Llorente-Berzal, A., Prada, C., Viveros, M.P., 2015. The maternal deprivation animal model revisited. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 51, 151-163, 10.1016/j.neubiorev.2015.01.015
203. Marrocco, J., Gray, J.D., Kogan, J.F., Einhorn, N.R., O'Conneide, E.M., Rubin, T.G., Carroll, T.S., Schmidt, E.F., McEwen, B.S., 2019. Early Life Stress Restricts Translational Reactivity in CA3 Neurons Associated With Altered Stress Responses in Adulthood. *Frontiers in behavioral neuroscience* 13, 157, 10.3389/fnbeh.2019.00157
204. Martijena, I.D., Rodriguez Manzanares, P.A., Lacerra, C., Molina, V.A., 2002. Gabaergic modulation of the stress response in frontal cortex and amygdala. *Synapse* 45, 86-94, 10.1002/syn.10085
205. Martinowich, K., Manji, H., Lu, B., 2007. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nature neuroscience* 10, 1089-1093, 10.1038/nn1971
206. Matsuzaki, H., Izumi, T., Matsumoto, M., Togashi, H., Yamaguchi, T., Yoshida, T., Watanabe, M., Yoshioka, M., 2009. Early postnatal stress affects 5-HT1A receptor function in the medial prefrontal cortex in adult rats. *Eur J Pharmacol* 615, 76-82, 10.1016/j.ejphar.2009.05.012
207. McEwen, B.S., 2000. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology* 22, 108-124, 10.1016/S0893-133X(99)00129-3
208. McGowan, P.O., Sasaki, A., D'Alessio, A.C., Dymov, S., Labonte, B., Szyf, M., Turecki, G., Meaney, M.J., 2009. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature neuroscience* 12, 342-348, 10.1038/nn.2270
209. McHugh, S.B., Deacon, R.M.J., Rawlins, J.N.P., Bannerman, D.M., 2004. Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behav Neurosci* 118, 63-78, 10.1037/0735-7044.118.1.63
210. McIlwrick, S., Rechenberg, A., Matthes, M., Burgstaller, J., Schwarzbauer, T., Chen, A., Touma, C., 2016. Genetic predisposition for high stress reactivity amplifies effects of early-life adversity. *Psychoneuroendocrinology* 70, 85-97, 10.1016/j.psyneuen.2016.04.023

211. McKenzie, A.T., Wang, M., Hauberg, M.E., Fullard, J.F., Kozlenkov, A., Keenan, A., Hurd, Y.L., Dracheva, S., Casaccia, P., Roussos, P., Zhang, B., 2018. Brain Cell Type Specific Gene Expression and Co-expression Network Architectures. *Scientific reports* 8, 8868, 10.1038/s41598-018-27293-5
212. McKibben, L.A., Dwivedi, Y., 2021a. Early-life stress induces genome-wide sex-dependent miRNA expression and correlation across limbic brain areas in rats. *Epigenomics* 13, 1031-1056, 10.2217/epi-2021-0037
213. McKibben, L.A., Dwivedi, Y., 2021b. Early life and adult stress promote sex dependent changes in hypothalamic miRNAs and environmental enrichment prevents stress-induced miRNA and gene expression changes in rats. *BMC genomics* 22, 701, 10.1186/s12864-021-08003-4
214. McLaughlin, K.A., Weissman, D., Bitran, D., 2019. Childhood Adversity and Neural Development: A Systematic Review. *Annual review of developmental psychology* 1, 277-312, 10.1146/annurev-devpsych-121318-084950
215. Meaney, M.J., Mitchell, J.B., Aitken, D.H., Bhatnagar, S., Bodnoff, S.R., Iny, L.J., Sarrieau, A., 1991. The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology* 16, 85-103,
216. Mehta, M., Schmauss, C., 2011. Strain-specific cognitive deficits in adult mice exposed to early life stress. *Behav Neurosci* 125, 29-36, 10.1037/a0021952
217. Meijer, J.H., Rietveld, W.J., 1989. Neurophysiology of the Suprachiasmatic Circadian Pacemaker in Rodents. *Physiol Rev* 69, 671-707,
218. Merkulov, V.M., Merkulova, T.I., Bondar, N.P., 2017. Mechanisms of Brain Glucocorticoid Resistance in Stress-Induced Psychopathologies. *Biochemistry (Mosc)* 82, 351-365, 10.1134/S0006297917030142
219. Millstein, R.A., Holmes, A., 2007. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 31, 3-17, 10.1016/j.neubiorev.2006.05.003

220. Mirescu, C., Peters, J.D., Gould, E., 2004. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nature neuroscience* 7, 841-846, 10.1038/nm1290
221. Mitchell, J.B., Iny, L.J., Meaney, M.J., 1990. The role of serotonin in the development and environmental regulation of type II corticosteroid receptor binding in rat hippocampus. *Brain research. Developmental brain research* 55, 231-235,
222. Miyazaki, H., Yamazaki, M., Watanabe, H., Maehama, T., Yokozeki, T., Kanaho, Y., 2005. The small GTPase ADP-ribosylation factor 6 negatively regulates dendritic spine formation. *FEBS letters* 579, 6834-6838, 10.1016/j.febslet.2005.11.022
223. Molet, J., Heins, K., Zhuo, X., Mei, Y.T., Regev, L., Baram, T.Z., Stern, H., 2016. Fragmentation and high entropy of neonatal experience predict adolescent emotional outcome. *Translational psychiatry* 6, e702, 10.1038/tp.2015.200
224. Montalvo-Ortiz, J.L., Bordner, K.A., Carlyle, B.C., Gelernter, J., Simen, A.A., Kaufman, J., 2016. The role of genes involved in stress, neural plasticity, and brain circuitry in depressive phenotypes: Convergent findings in a mouse model of neglect. *Behavioural brain research* 315, 71-74, 10.1016/j.bbr.2016.08.010
225. Montes-Rodriguez, C.J., Lapointe, V., Trivedi, V., Lu, Q., Demchuk, A.M., McNaughton, B.L., 2013. Postnatal Development of Homer1a in the Rat Hippocampus. *Hippocampus* 23, 890-902, 10.1002/hipo.22146
226. Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods* 11, 47-60, 10.1016/0165-0270(84)90007-4
227. Moutin, E., Raynaud, F., Roger, J., Pellegrino, E., Homburger, V., Bertaso, F., Ollendorff, V., Bockaert, J., Fagni, L., Perroy, J., 2012. Dynamic remodeling of scaffold interactions in dendritic spines controls synaptic excitability. *J Cell Biol* 198, 251-263, 10.1083/jcb.201110101
228. Murgatroyd, C., Patchev, A.V., Wu, Y., Micale, V., Bockmuhl, Y., Fischer, D., Holsboer, F., Wotjak, C.T., Almeida, O.F., Spengler, D., 2009. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nature neuroscience* 12, 1559-1566, 10.1038/nn.2436
229. Nair, A., Vadodaria, K.C., Banerjee, S.B., Benekareddy, M., Dias, B.G., Duman, R.S., Vaidya, V.A., 2007a. Stressor-specific regulation of

- distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the postnatal and adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 32, 1504-1519, 10.1038/sj.npp.1301276
230. Nair, A., Vadodaria, K.C., Banerjee, S.B., Benekareddy, M., Dias, B.G., Duman, R.S., Vaidya, V.A., 2007b. Stressor-specific regulation of distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the postnatal and adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32, 1504-1519, 10.1038/sj.npp.1301276
231. Nasca, C., Menard, C., Hodes, G., Bigio, B., Pena, C., Lorsch, Z., Zelli, D., Ferris, A., Kana, V., Purushothaman, I., Dobbin, J., Nassim, M., DeAngelis, P., Merad, M., Rasgon, N., Meaney, M., Nestler, E.J., McEwen, B.S., Russo, S.J., 2019. Multidimensional Predictors of Susceptibility and Resilience to Social Defeat Stress. *Biological psychiatry* 86, 483-491, 10.1016/j.biopsych.2019.06.030
232. Navailles, S., Zimnisky, R., Schmauss, C., 2010a. Expression of glucocorticoid receptor and early growth response gene 1 during postnatal development of two inbred strains of mice exposed to early life stress. *Developmental neuroscience* 32, 139-148, 10.1159/000293989
233. Navailles, S., Zimnisky, R., Schmauss, C., 2010b. Expression of Glucocorticoid Receptor and Early Growth Response Gene 1 during Postnatal Development of Two Inbred Strains of Mice Exposed to Early Life Stress. *Dev Neurosci-Basel* 32, 139-148, 10.1159/000293989
234. Nave, K.A., Werner, H.B., 2014. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annual review of cell and developmental biology* 30, 503-533, 10.1146/annurev-cellbio-100913-013101
235. Nemeroff, C.B., 2016. Paradise Lost: The Neurobiological and Clinical Consequences of Child Abuse and Neglect. *Neuron* 89, 892-909, 10.1016/j.neuron.2016.01.019
236. Nemeroff, C.B., Heim, C.M., Thase, M.E., Klein, D.N., Rush, A.J., Schatzberg, A.F., Ninan, P.T., McCullough, J.P., Jr., Weiss, P.M., Dunner, D.L., Rothbaum, B.O., Kornstein, S., Keitner, G., Keller, M.B., 2003. Differential responses to psychotherapy versus pharmacotherapy in patients with chronic forms of major depression and childhood trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14293-14296, 10.1073/pnas.2336126100

237. Nestler, E.J., Hyman, S.E., 2010. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience* 13, 1161-1169, 10.1038/nn.2647
238. Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., Struhl, K., 2003. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Molecular cell* 11, 709-719, 10.1016/s1097-2765(03)00092-3
239. Nguyen, H.B., Bagot, R.C., Diorio, J., Wong, T.P., Meaney, M.J., 2015. Maternal Care Differentially Affects Neuronal Excitability and Synaptic Plasticity in the Dorsal and Ventral Hippocampus. *Neuropsychopharmacol* 40, 1590-1599, 10.1038/npp.2015.19
240. Niswender, C.M., Conn, P.J., 2010. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology* 50, 295-322, 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533
241. Novais, A., Monteiro, S., Roque, S., Correia-Neves, M., Sousa, N., 2017. How age, sex and genotype shape the stress response. *Neurobiology of stress* 6, 44-56, 10.1016/j.ynstr.2016.11.004
242. Odeon, M.M., Yamauchi, L., Grosman, M., Acosta, G.B., 2017. Long-term effects of repeated maternal separation and ethanol intake on HPA axis responsiveness in adult rats. *Brain research* 1657, 193-201, 10.1016/j.brainres.2016.11.034
243. Oreland, S., Nylander, I., Pickering, C., 2010. Prolonged maternal separation decreases granule cell number in the dentate gyrus of 3-week-old male rats. *Int J Dev Neurosci* 28, 139-144, 10.1016/j.ijdevneu.2009.12.005
244. Orso, R., Wearick-Silva, L.E., Creutzberg, K.C., Centeno-Silva, A., Glusman Roithmann, L., Pazzin, R., Tractenberg, S.G., Benetti, F., Grassi-Oliveira, R., 2018. Maternal behavior of the mouse dam toward pups: implications for maternal separation model of early life stress. *Stress* 21, 19-27, 10.1080/10253890.2017.1389883
245. Paulsen, O., Moser, E.I., 1998. A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* 21, 273-278, 10.1016/s0166-2236(97)01205-8
246. Pena, C.J., Kronman, H.G., Walker, D.M., Cates, H.M., Bagot, R.C., Purushothaman, I., Issler, O., Loh, Y.E., Leong, T., Kiraly, D.D., Goodman, E., Neve, R.L., Shen, L., Nestler, E.J., 2017. Early life stress confers lifelong

- stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. *Science* 356, 1185-1188, [10.1126/science.aan4491](https://doi.org/10.1126/science.aan4491)
247. Pena, C.J., Smith, M., Ramakrishnan, A., Cates, H.M., Bagot, R.C., Kronman, H.G., Patel, B., Chang, A.B., Purushothaman, I., Dudley, J., Morishita, H., Shen, L., Nestler, E.J., 2019a. Early life stress alters transcriptomic patterning across reward circuitry in male and female mice. *Nat Commun* 10, Artn 5098
248. [10.1038/S41467-019-13085-6](https://doi.org/10.1038/S41467-019-13085-6)
249. Pena, C.J., Smith, M., Ramakrishnan, A., Cates, H.M., Bagot, R.C., Kronman, H.G., Patel, B., Chang, A.B., Purushothaman, I., Dudley, J., Morishita, H., Shen, L., Nestler, E.J., 2019b. Early life stress alters transcriptomic patterning across reward circuitry in male and female mice. *Nature communications* 10, 5098, [10.1038/s41467-019-13085-6](https://doi.org/10.1038/s41467-019-13085-6)
250. Perez-Gonzalez, R., Sahoo, S., Gauthier, S.A., Kim, Y., Li, M., Kumar, A., Pawlik, M., Benussi, L., Ghidoni, R., Levy, E., 2019. Neuroprotection mediated by cystatin C-loaded extracellular vesicles. *Scientific reports* 9, 11104, [10.1038/s41598-019-47524-7](https://doi.org/10.1038/s41598-019-47524-7)
251. Perroud, N., Salzmann, A., Prada, P., Nicastro, R., Hoeppli, M.E., Furrer, S., Ardu, S., Krejci, I., Karege, F., Malafosse, A., 2013. Response to psychotherapy in borderline personality disorder and methylation status of the BDNF gene. *Translational psychiatry* 3, e207, [10.1038/tp.2012.140](https://doi.org/10.1038/tp.2012.140)
252. Pickering, C., Gustafsson, L., Cebere, A., Nylander, I., Liljequist, S., 2006. Repeated maternal separation of male Wistar rats alters glutamate receptor expression in the hippocampus but not the prefrontal cortex. *Brain research* 1099, 101-108, [10.1016/j.brainres.2006.04.136](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.04.136)
253. Pilkay, S.R., Combs-Orme, T., Tylavsky, F., Bush, N., Smith, A.K., 2020. Maternal trauma and fear history predict BDNF methylation and gene expression in newborns. *PeerJ* 8, e8858, [10.7717/peerj.8858](https://doi.org/10.7717/peerj.8858)
254. Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain research. Molecular brain research* 18, 195-200, [10.1016/0169-328x\(93\)90189-v](https://doi.org/10.1016/0169-328x(93)90189-v)
255. Plotsky, P.M., Thrivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Caldji, C., Sharma, S., Meaney, M.J., 2005. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat

- offspring. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 30, 2192-2204, 10.1038/sj.npp.1300769
256. Poole, J.C., Dobson, K.S., Pusch, D., 2017. Anxiety among adults with a history of childhood adversity: Psychological resilience moderates the indirect effect of emotion dysregulation. *Journal of affective disorders* 217, 144-152, 10.1016/j.jad.2017.03.047
257. Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 229, 327-336,
258. Provencal, N., Suderman, M.J., Guillemin, C., Massart, R., Ruggiero, A., Wang, D., Bennett, A.J., Pierre, P.J., Friedman, D.P., Cote, S.M., Hallett, M., Tremblay, R.E., Suomi, S.J., Szyf, M., 2012. The signature of maternal rearing in the methylome in rhesus macaque prefrontal cortex and T cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 15626-15642, 10.1523/JNEUROSCI.1470-12.2012
259. Pruunsild, P., Kazantseva, A., Aid, T., Palm, K., Timmusk, T., 2007. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90, 397-406, 10.1016/j.ygeno.2007.05.004
260. Pryce, C.R., Feldon, J., 2003. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 27, 57-71,
261. Racekova, E., Lievajova, K., Danko, J., Martoncikova, M., Flesarova, S., Almasiova, V., Orendacova, J., 2009. Maternal Separation Induced Alterations of Neurogenesis in the Rat Rostral Migratory Stream. *Cell Mol Neurobiol* 29, 811-819, 10.1007/s10571-009-9362-x
262. Rao, R., Androulakis, I.P., 2019. The physiological significance of the circadian dynamics of the HPA axis: Interplay between circadian rhythms, allostasis and stress resilience. *Hormones and behavior* 110, 77-89, 10.1016/j.yhbeh.2019.02.018
263. Reshetnikov, V., Studenikina, A., Ryabushkina, J., Merkulova T., Bondar, N., 2018. The impact of early-life stress on the expression of HPA-associated genes in the adult murine brain. *Behaviour* 155, 10.1163/1568539X-00003482

264. Reshetnikov, V.V., Bondar, N.P., 2021. The Role of Stress-Induced Changes of Homer1 Expression in Stress Susceptibility. *Biochemistry. Biokhimiia* 86, 613-626, 10.1134/S0006297921060018
265. Reshetnikov, V.V., Kisaretova, P.E., Bondar, N.P., 2022. Transcriptome Alterations Caused by Social Defeat Stress of Various Durations in Mice and Its Relevance to Depression and Posttraumatic Stress Disorder in Humans: A Meta-Analysis. *International journal of molecular sciences* 23, 10.3390/ijms232213792
266. Reshetnikov, V.V., Kisaretova, P.E., Ershov, N.I., Merkulova, T.I., Bondar, N.P., 2020a. Social defeat stress in adult mice causes alterations in gene expression, alternative splicing, and the epigenetic landscape of H3K4me3 in the prefrontal cortex: An impact of early-life stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 110068, 10.1016/j.pnpbp.2020.110068
267. Reshetnikov, V.V., Kovner, A.V., Lepeshko, A.A., Pavlov, K.S., Grinkevich, L.N., Bondar, N.P., 2020b. Stress early in life leads to cognitive impairments, reduced numbers of CA3 neurons and altered maternal behavior in adult female mice. *Genes, brain, and behavior* 19, e12541, 10.1111/gbb.12541
268. Reul, J.M., van den Bosch, F.R., de Kloet, E.R., 1987. Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications. *The Journal of endocrinology* 115, 459-467,
269. Rice, C.J., Sandman, C.A., Lenjavi, M.R., Baram, T.Z., 2008. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology* 149, 4892-4900, 10.1210/en.2008-0633
270. Rietschel, M., Mattheisen, M., Frank, J., Treutlein, J., Degenhardt, F., Breuer, R., Steffens, M., Mier, D., Esslinger, C., Walter, H., Kirsch, P., Erk, S., Schnell, K., Herms, S., Wichmann, H.E., Schreiber, S., Jockel, K.H., Strohmaier, J., Roeske, D., Haenisch, B., Gross, M., Hoefels, S., Lucae, S., Binder, E.B., Wienker, T.F., Schulze, T.G., Schmal, C., Zimmer, A., Juraeva, D., Brors, B., Bettecken, T., Meyer-Lindenberg, A., Muller-Myhsok, B., Maier, W., Nothen, M.M., Cichon, S., 2010. Genome-wide association-, replication-, and neuroimaging study implicates HOMER1 in the etiology of major depression. *Biological psychiatry* 68, 578-585, 10.1016/j.biopsych.2010.05.038
271. Roceri, M., Cirulli, F., Pessina, C., Peretto, P., Racagni, G., Riva, M.A., 2004. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-

- dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiat* 55, 708-714, 10.1016/j.biopsych.2003.12.011
272. Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Ellenbroek, B.A., Riva, M.A., 2002a. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatr* 7, 609-616, 10.1038/sj.mp.4001036
273. Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Ellenbroek, B.A., Riva, M.A., 2002b. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Molecular psychiatry* 7, 609-616, 10.1038/sj.mp.4001036
274. Rocha, M., Wang, D., Avila-Quintero, V., Bloch, M.H., Kaffman, A., 2021. Deficits in hippocampal-dependent memory across different rodent models of early life stress: systematic review and meta-analysis. *Translational psychiatry* 11, 231, 10.1038/s41398-021-01352-4
275. Rose, S., Nelson, J., 1956. Hydrocortisone and A.C.T.H. release. *The Australian journal of experimental biology and medical science* 34, 77-80,
276. Roth, M.G., 2004. Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiological reviews* 84, 699-730, 10.1152/physrev.00033.2003
277. Roth, T.L., Lubin, F.D., Funk, A.J., Sweatt, J.D., 2009. Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biological psychiatry* 65, 760-769, 10.1016/j.biopsych.2008.11.028
278. Roth, T.L., Sweatt, J.D., 2011. Epigenetic marking of the BDNF gene by early-life adverse experiences. *Horm Behav* 59, 315-320, 10.1016/j.yhbeh.2010.05.005
279. Rousseaud, A., Delepine, C., Nectoux, J., Billuart, P., Bienvenu, T., 2015. Differential Expression and Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) mRNA Isoforms in Brain Cells from *Mecp2(308/y)* Mouse Model. *Journal of molecular neuroscience : MN* 56, 758-767, 10.1007/s12031-014-0487-0
280. Roy, A.K., Shehzad, Z., Margulies, D.S., Kelly, A.M.C., Uddin, L.Q., Gotimer, K., Biswal, B.B., Castellanos, F.X., Milham, M.P., 2009. Functional connectivity of the human amygdala using resting state fMRI. *Neuroimage* 45, 614-626, 10.1016/j.neuroimage.2008.11.030

281. Saab, A.S., Tzvetanova, I.D., Nave, K.A., 2013. The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Current opinion in neurobiology* 23, 1065-1072, 10.1016/j.conb.2013.09.008
282. Sachs, B.D., Rodriguiz, R.M., Siesser, W.B., Kenan, A., Royer, E.L., Jacobsen, J.P., Wetsel, W.C., Caron, M.G., 2013. The effects of brain serotonin deficiency on behavioural disinhibition and anxiety-like behaviour following mild early life stress. *The international journal of neuropsychopharmacology* 16, 2081-2094, 10.1017/S1461145713000321
283. Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., Pandolfi, P.P., 2011. A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? *Cell* 146, 353-358, 10.1016/j.cell.2011.07.014
284. Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J., Kouzarides, T., 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-411, 10.1038/nature01080
285. Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A., Roche, K.W., 2013. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 19, 62-75, 10.1177/1073858411435129
286. Sapolsky, R.M., 1985. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: temporal aspects of neuronal vulnerability. *Brain Res* 359, 300-305,
287. Sapolsky, R.M., Meaney, M.J., 1986a. Maturation of the Adrenocortical Stress Response - Neuroendocrine Control Mechanisms and the Stress Hyporesponsive Period. *Brain Res Rev* 11, 65-76, Doi 10.1016/0165-0173(86)90010-X
288. Sapolsky, R.M., Meaney, M.J., 1986b. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain research* 396, 64-76, 10.1016/s0006-8993(86)80190-1
289. Sato, T.K., Panda, S., Miraglia, L.J., Reyes, T.M., Rudic, R.D., McNamara, P., Naik, K.A., FitzGerald, G.A., Kay, S.A., Hogenesch, J.B., 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43, 527-537, 10.1016/j.neuron.2004.07.018

290. Savignac, H.M., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2011. Resistance to early-life stress in mice: effects of genetic background and stress duration. *Front Behav Neurosci* 5, 13, 10.3389/fnbeh.2011.00013
291. Scarpa, J.R., Fatma, M., Loh, Y.E., Traore, S.R., Stefan, T., Chen, T.H., Nestler, E.J., Labonte, B., 2020. Shared Transcriptional Signatures in Major Depressive Disorder and Mouse Chronic Stress Models. *Biological psychiatry* 88, 159-168, 10.1016/j.biopsych.2019.12.029
292. Schapiro, S., 1962. Pituitary ACTH and compensatory adrenal hypertrophy in stress-non-responsive infant rats. *Endocrinology* 71, 986-989, 10.1210/endo-71-6-986
293. Schapiro, S., Marmorston, J., Sobel, H., 1958. The steroid feedback mechanism. *Am J Physiol* 192, 58-62,
294. Schmidt, M., Enthoven, L., van der Mark, M., Levine, S., de Kloet, E.R., Oitzl, M.S., 2003. The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse. *Int J Dev Neurosci* 21, 125-132, 10.1016/S0736-5748(03)00030-3
295. Schmidt, M., Enthoven, L., van Woezik, J.H., Levine, S., de Kloet, E.R., Oitzl, M.S., 2004. The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *Journal of neuroendocrinology* 16, 52-57, 10.1111/j.1365-2826.2004.01123.x
296. Schmidt, M.V., 2010. Molecular mechanisms of early life stress--lessons from mouse models. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 34, 845-852, 10.1016/j.neubiorev.2009.05.002
297. Schule, C., Nothdurfter, C., Rupprecht, R., 2014. The role of allopregnanolone in depression and anxiety. *Progress in neurobiology* 113, 79-87, 10.1016/j.pneurobio.2013.09.003
298. Schumacher, J., Jamra, R.A., Becker, T., Ohlraun, S., Klopp, N., Binder, E.B., Schulze, T.G., Deschner, M., Schmal, C., Hofels, S., Zobel, A., Illig, T., Propping, P., Holsboer, F., Rietschel, M., Nothen, M.M., Cichon, S., 2005. Evidence for a relationship between genetic variants at the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) locus and major depression. *Biological psychiatry* 58, 307-314, 10.1016/j.biopsych.2005.04.006
299. Schwarz, J.M., Bilbo, S.D., 2011. LPS elicits a much larger and broader inflammatory response than *Escherichia coli* infection within the hippocampus of neonatal rats. *Neuroscience letters* 497, 110-115, 10.1016/j.neulet.2011.04.042

300. Schweizer, S., Walsh, N.D., Stretton, J., Dunn, V.J., Goodyer, I.M., Dalgleish, T., 2016. Enhanced emotion regulation capacity and its neural substrates in those exposed to moderate childhood adversity. *Social cognitive and affective neuroscience* 11, 272-281, 10.1093/scan/nsv109
301. Seery, M.D., Holman, E.A., Silver, R.C., 2010. Whatever does not kill us: cumulative lifetime adversity, vulnerability, and resilience. *Journal of personality and social psychology* 99, 1025-1041, 10.1037/a0021344
302. Seo, M.K., Ly, N.N., Lee, C.H., Cho, H.Y., Choi, C.M., Nhu, L.H., Lee, J.G., Lee, B.J., Kim, G.M., Yoon, B.J., Park, S.W., Kim, Y.H., 2016. Early life stress increases stress vulnerability through BDNF gene epigenetic changes in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 105, 388-397, 10.1016/j.neuropharm.2016.02.009
303. Serchov, T., Heumann, R., van Calker, D., Biber, K., 2016. Signaling pathways regulating Homer1a expression: implications for antidepressant therapy. *Biol Chem* 397, 207-214, 10.1515/hsz-2015-0267
304. Shapero, B.G., Hamilton, J.L., Stange, J.P., Liu, R.T., Abramson, L.Y., Alloy, L.B., 2015. Moderate Childhood Stress Buffers Against Depressive Response to Proximal Stressors: A Multi-Wave Prospective Study of Early Adolescents. *Journal of abnormal child psychology* 43, 1403-1413, 10.1007/s10802-015-0021-z
305. Shepard, R.D., Gouty, S., Kassis, H., Berenji, A., Zhu, W., Cox, B.M., Nugent, F.S., 2018. Targeting histone deacetylation for recovery of maternal deprivation-induced changes in BDNF and AKAP150 expression in the VTA. *Exp Neurol* 309, 160-168, 10.1016/j.expneurol.2018.08.002
306. Shiraishi-Yamaguchi, Y., Furuichi, T., 2007. The Homer family proteins. *Genome Biol* 8, 10.1186/Gb-2007-8-2-206
307. Siehl, S., King, J.A., Burgess, N., Flor, H., Nees, F., 2018. Structural white matter changes in adults and children with posttraumatic stress disorder: A systematic review and meta-analysis. *NeuroImage. Clinical* 19, 581-598, 10.1016/j.nicl.2018.05.013
308. Smagin, D.A., Kovalenko, I.L., Galyamina, A.G., Bragin, A.O., Orlov, Y.L., Kudryavtseva, N.N., 2016. Dysfunction in Ribosomal Gene Expression in the Hypothalamus and Hippocampus following Chronic Social Defeat Stress in Male Mice as Revealed by RNA-Seq. *Neural plasticity* 2016, 3289187, 10.1155/2016/3289187

309. Smagin, D.A., Kovalenko, I.L., Galyamina, A.G., Orlov, Y.L., Babenko, V.N., Kudryavtseva, N.N., 2018. Heterogeneity of Brain Ribosomal Genes Expression Following Positive Fighting Experience in Male Mice as Revealed by RNA-Seq. *Molecular neurobiology* 55, 390-401, 10.1007/s12035-016-0327-z
310. Srinivasan, V., Singh, J., Pandi-Perumal, S.R., Brown, G.M., Spence, D.W., Cardinali, D.P., 2010. Jet lag, circadian rhythm sleep disturbances, and depression: the role of melatonin and its analogs. *Advances in therapy* 27, 796-813, 10.1007/s12325-010-0065-y
311. St Laurent, G., Wahlestedt, C., Kapranov, P., 2015. The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends Genet* 31, 239-251, 10.1016/j.tig.2015.03.007
312. Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., Simons, M., 2019. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiological reviews* 99, 1381-1431, 10.1152/physrev.00031.2018
313. Stankiewicz, A.M., Goscik, J., Majewska, A., Swiergiel, A.H., Juszcak, G.R., 2015. The Effect of Acute and Chronic Social Stress on the Hippocampal Transcriptome in Mice. *PloS one* 10, e0142195, 10.1371/journal.pone.0142195
314. Stankiewicz, A.M., Swiergiel, A.H., Lisowski, P., 2013. Epigenetics of stress adaptations in the brain. *Brain Research Bulletin* 98, 76-92, 10.1016/j.brainresbull.2013.07.003
315. Stenz, L., Schechter, D.S., Serpa, S.R., Paoloni-Giacobino, A., 2018. Intergenerational Transmission of DNA Methylation Signatures Associated with Early Life Stress. *Current genomics* 19, 665-675, 10.2174/1389202919666171229145656
316. Stopa, N., Krebs, J.E., Shechter, D., 2015. The PRMT5 arginine methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72, 2041-2059, 10.1007/s00018-015-1847-9
317. Suchecki, D., Rosenfeld, P., Levine, S., 1993. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain research. Developmental brain research* 75, 185-192,
318. Sun, P., Wang, F.R., Wang, L., Zhang, Y., Yamamoto, R., Sugai, T., Zhang, Q., Wang, Z.D., Kato, N., 2011. Increase in Cortical Pyramidal Cell

- Excitability Accompanies Depression-Like Behavior in Mice: A Transcranial Magnetic Stimulation Study. *Journal of Neuroscience* 31, 16464-16472, 10.1523/Jneurosci.1542-11.2011
319. Sun, P., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, F.R., Chen, R., Yamamoto, R., Kato, N., 2015. Homer1a-dependent recovery from depression-like behavior by photic stimulation in mice. *Physiol Behav* 147, 334-341, 10.1016/j.physbeh.2015.05.007
320. Suri, D., Vaidya, V.A., 2013. Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. *Neuroscience* 239, 196-213, 10.1016/j.neuroscience.2012.08.065
321. Svirin, E., de Munter, J., Umriukhin, A., Sheveleva, E., Kalueff, A.V., Svistunov, A., Morozov, S., Walitza, S., Strekalova, T., 2022. Aberrant Ganglioside Functions to Underpin Dysregulated Myelination, Insulin Signalling, and Cytokine Expression: Is There a Link and a Room for Therapy? *Biomolecules* 12, 10.3390/biom12101434
322. Szumlinski, K.K., Kalivas, P.W., Worley, P.F., 2006. Homer proteins: implications for neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Neurobiol* 16, 251-257, 10.1016/j.conb.2006.05.002
323. Szumlinski, K.K., Lominac, K.D., Kleschen, M.J., Oleson, E.B., Dehoff, M.H., Schwartz, M.K., Seeberg, P.H., Worley, P.F., Kalivast, P.W., 2005. Behavioral and neurochemical phenotyping of Homer1 mutant mice: possible relevance to schizophrenia. *Genes Brain and Behavior* 4, 273-288, 10.1111/j.1601-183X.2005.00120.x
324. Takahashi, J.S., 2017. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature reviews. Genetics* 18, 164-179, 10.1038/nrg.2016.150
325. Tanaka, Y., Katagiri, Z., Kawahashi, K., Kioussis, D., Kitajima, S., 2007. Trithorax-group protein ASH1 methylates histone H3 lysine 36. *Gene* 397, 161-168, 10.1016/j.gene.2007.04.027
326. Tasaki, T., Mulder, L.C., Iwamatsu, A., Lee, M.J., Davydov, I.V., Varshavsky, A., Muesing, M., Kwon, Y.T., 2005. A family of mammalian E3 ubiquitin ligases that contain the UBR box motif and recognize N-degrons. *Molecular and cellular biology* 25, 7120-7136, 10.1128/MCB.25.16.7120-7136.2005

327. Teicher, M.H., Samson, J.A., 2016. Annual Research Review: Enduring neurobiological effects of childhood abuse and neglect. *J Child Psychol Psyc* 57, 241-266, 10.1111/jcpp.12507
328. Teicher, M.H., Samson, J.A., Anderson, C.M., Ohashi, K., 2016. The effects of childhood maltreatment on brain structure, function and connectivity. *Nat Rev Neurosci* 17, 652-666, 10.1038/nrn.2016.111
329. Thomazeau, A., Bosch, M., Essayan-Perez, S., Barnes, S.A., De Jesus-Cortes, H., Bear, M.F., 2020. Dissociation of functional and structural plasticity of dendritic spines during NMDAR and mGluR-dependent long-term synaptic depression in wild-type and fragile X model mice. *Mol Psychiatr*, 10.1038/s41380-020-0821-6
330. Torres-Berrio, A., Issler, O., Parise, E.M., Nestler, E.J., 2019. Unraveling the epigenetic landscape of depression: focus on early life stress. *Dialogues Clin Neuro* 21, 341-357, 10.31887/Dcns.2019.21.4/Enestler
331. Tractenberg, S.G., Levandowski, M.L., de Azeredo, L.A., Orso, R., Roithmann, L.G., Hoffmann, E.S., Brenhouse, H., Grassi-Oliveira, R., 2016a. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci Biobehav R* 68, 489-503, 10.1016/j.neubiorev.2016.06.021
332. Tractenberg, S.G., Levandowski, M.L., de Azeredo, L.A., Orso, R., Roithmann, L.G., Hoffmann, E.S., Brenhouse, H., Grassi-Oliveira, R., 2016b. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 68, 489-503, 10.1016/j.neubiorev.2016.06.021
333. Turrigiano, G.G., Nelson, S.B., 2004. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5, 97-107, 10.1038/nrn1327
334. Ur, E., Grossman, A., 1992. Corticotropin-Releasing Hormone in Health and Disease - an Update. *Acta Endocrinol-Cop* 127, 193-199, DOI 10.1530/acta.0.1270193
335. Vakoc, C.R., Mandat, S.A., Olenschock, B.A., Blobel, G.A., 2005. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Blood* 106, 493a-493a,

336. van Bodegom, M., Homberg, J.R., Henckens, M., 2017. Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Frontiers in cellular neuroscience* 11, 87, 10.3389/fncel.2017.00087
337. van der Doelen, R.H., Calabrese, F., Guidotti, G., Geenen, B., Riva, M.A., Kozicz, T., Homberg, J.R., 2014a. Early life stress and serotonin transporter gene variation interact to affect the transcription of the glucocorticoid and mineralocorticoid receptors, and the co-chaperone FKBP5, in the adult rat brain. *Frontiers in behavioral neuroscience* 8, 355, 10.3389/fnbeh.2014.00355
338. van der Doelen, R.H., Deschamps, W., D'Annibale, C., Peeters, D., Wevers, R.A., Zelena, D., Homberg, J.R., Kozicz, T., 2014b. Early life adversity and serotonin transporter gene variation interact at the level of the adrenal gland to affect the adult hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Translational psychiatry* 4, e409, 10.1038/tp.2014.57
339. van Harmelen, A.L., van Tol, M.J., Demenescu, L.R., van der Wee, N.J.A., Veltman, D.J., Aleman, A., van Buchem, M.A., Spinhoven, P., Penninx, B.W.J.H., Elzinga, B.M., 2013. Enhanced amygdala reactivity to emotional faces in adults reporting childhood emotional maltreatment. *Soc Cogn Affect Neur* 8, 362-369, 10.1093/scan/nss007
340. van Hasselt, F.N., Cornelisse, S., Zhang, T.Y., Meaney, M.J., Velzing, E.H., Krugers, H.J., Joels, M., 2012. Adult hippocampal glucocorticoid receptor expression and dentate synaptic plasticity correlate with maternal care received by individuals early in life. *Hippocampus* 22, 255-266, 10.1002/hipo.20892
341. Varghese, A.K., Verdu, E.F., Bercik, P., Khan, W.I., Blennerhassett, P.A., Szechtman, H., Collins, S.M., 2006. Antidepressants attenuate increased susceptibility to colitis in a murine model of depression. *Gastroenterology* 130, 1743-1753, 10.1053/j.gastro.2006.02.007
342. Vazquez, D.M., Bailey, C., Dent, G.W., Okimoto, D.K., Steffek, A., Lopez, J.F., Levine, S., 2006. Brain corticotropin-releasing hormone (CRH) circuits in the developing rat: Effect of maternal deprivation. *Brain Res* 1121, 83-94, 10.1016/j.brainres.2006.08.104
343. Vazquez, D.M., Eskandari, R., Phelka, A., Lopez, J.F., 2003. Impact of maternal deprivation on brain corticotropin-releasing hormone circuits: prevention of CRH receptor-2 mRNA changes by desipramine treatment. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28, 898-909, 10.1038/sj.npp.1300126

344. Veenema, A.H., Blume, A., Niederle, D., Buwalda, B., Neumann, I.D., 2006. Effects of early life stress on adult male aggression and hypothalamic vasopressin and serotonin. *The European journal of neuroscience* 24, 1711-1720, 10.1111/j.1460-9568.2006.05045.x
345. Veenema, A.H., Bredewold, R., Neumann, I.D., 2007. Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology* 32, 437-450, 10.1016/j.psyneuen.2007.02.008
346. Veenema, A.H., Neumann, I.D., 2009. Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. *Psychoneuroendocrinology* 34, 463-467, 10.1016/j.psyneuen.2008.10.017
347. Vetulani, J., 2013. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacological reports : PR* 65, 1451-1461, 10.1016/s1734-1140(13)71505-6
348. Vinkers, C.H., Joels, M., Milaneschi, Y., Kahn, R.S., Penninx, B.W., Boks, M.P., 2014. Stress exposure across the life span cumulatively increases depression risk and is moderated by neuroticism. *Depression and anxiety* 31, 737-745, 10.1002/da.22262
349. Viveros, M.P., Diaz, F., Mateos, B., Rodriguez, N., Chowen, J.A., 2010. Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Horm Behav* 57, 405-414, 10.1016/j.yhbeh.2010.01.009
350. Voellmin, A., Winzeler, K., Hug, E., Wilhelm, F.H., Schaefer, V., Gaab, J., La Marca, R., Pruessner, J.C., Bader, K., 2015. Blunted endocrine and cardiovascular reactivity in young healthy women reporting a history of childhood adversity. *Psychoneuroendocrinology* 51, 58-67, 10.1016/j.psyneuen.2014.09.008
351. Walker, A.G., Wenthur, C.J., Xiang, Z., Rook, J.M., Emmitte, K.A., Niswender, C.M., Lindsley, C.W., Conn, P.J., 2015. Metabotropic glutamate receptor 3 activation is required for long-term depression in medial prefrontal cortex and fear extinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 1196-1201, 10.1073/pnas.1416196112

352. Walker, C.D., Bath, K.G., Joels, M., Korosi, A., Larauche, M., Lucassen, P.J., Morris, M.J., Raineke, C., Roth, T.L., Sullivan, R.M., Tache, Y., Baram, T.Z., 2017. Chronic early life stress induced by limited bedding and nesting (LBN) material in rodents: critical considerations of methodology, outcomes and translational potential. *Stress* 20, 421-448, 10.1080/10253890.2017.1343296
353. Wang, A.H., Zare, H., Mousavi, K., Wang, C., Moravec, C.E., Sirotkin, H.I., Ge, K., Gutierrez-Cruz, G., Sartorelli, V., 2013. The histone chaperone Spt6 coordinates histone H3K27 demethylation and myogenesis. *The EMBO journal* 32, 1075-1086, 10.1038/emboj.2013.54
354. Wang, C.S., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., 2022. BDNF signaling in context: From synaptic regulation to psychiatric disorders. *Cell* 185, 62-76, 10.1016/j.cell.2021.12.003
355. Wang, D., Levine, J.L.S., Avila-Quintero, V., Bloch, M., Kaffman, A., 2020a. Systematic review and meta-analysis: effects of maternal separation on anxiety-like behavior in rodents. *Translational psychiatry* 10, 174, 10.1038/s41398-020-0856-0
356. Wang, L., Jiao, J.W., Dulawa, S.C., 2011. Infant maternal separation impairs adult cognitive performance in BALB/cJ mice. *Psychopharmacology* 216, 207-218, 10.1007/s00213-011-2209-4
357. Wang, W., Liu, W., Duan, D., Bai, H., Wang, Z., Xing, Y., 2021. Chronic social defeat stress mouse model: Current view on its behavioral deficits and modifications. *Behavioral neuroscience* 135, 326-335, 10.1037/bne0000418
358. Wang, X.D., Labermaier, C., Holsboer, F., Wurst, W., Deussing, J.M., Muller, M.B., Schmidt, M.V., 2012. Early-life stress-induced anxiety-related behavior in adult mice partially requires forebrain corticotropin-releasing hormone receptor 1. *The European journal of neuroscience* 36, 2360-2367, 10.1111/j.1460-9568.2012.08148.x
359. Wang, X.X., Zhang, B., Xia, R., Jia, Q.Y., 2020b. Inflammation, apoptosis and autophagy as critical players in vascular dementia. *European review for medical and pharmacological sciences* 24, 9601-9614, 10.26355/eurrev_202009_23048
360. Wang, Y., Rao, W., Zhang, C., Liu, M.D., Han, F., Yao, L.B., Han, H., Luo, P., Su, N., Fei, Z., 2015a. Scaffolding protein Homer1a protects

- against NMDA-induced neuronal injury. *Cell death & disease* 6, e1843, 10.1038/cddis.2015.216
361. Wang, Y., Rao, W., Zhang, C., Zhang, C., Liu, M.D., Han, F., Yao, L.B., Han, H., Luo, P., Su, N., Fei, Z., 2015b. Scaffolding protein Homer1a protects against NMDA-induced neuronal injury. *Cell Death Dis* 6, 10.1038/Cddis.2015.216
362. Wang, Y., Zhao, M.M., Shang, L., Zhang, Y.G., Huang, C.G., He, Z.Q., Luo, M., Wu, B., Song, P., Wang, M.Y., Duan, F.L., 2020c. Homer1a protects against neuronal injury via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Int J Neurosci* 130, 621-630, 10.1080/00207454.2019.1702535
363. Wang, Z.B., Zang, C.Z., Cui, K.R., Schones, D.E., Barski, A., Peng, W.Q., Zhao, K.J., 2009. Genome-wide Mapping of HATs and HDACs Reveals Distinct Functions in Active and Inactive Genes. *Cell* 138, 1019-1031, 10.1016/j.cell.2009.06.049
364. Warburton, E.C., Barker, G.R., Brown, M.W., 2013. Investigations into the involvement of NMDA mechanisms in recognition memory. *Neuropharmacology* 74, 41-47, 10.1016/j.neuropharm.2013.04.013
365. Weiss, I.C., Pryce, C.R., Jongen-Relo, A.L., Nanz-Bahr, N.I., Feldon, J., 2004. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural brain research* 152, 279-295, 10.1016/j.bbr.2003.10.015
366. Willner, P., 2017. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of stress* 6, 78-93, 10.1016/j.ynstr.2016.08.002
367. Wisden, W., Laurie, D.J., Monyer, H., Seeburg, P.H., 1992. The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12, 1040-1062, 10.1523/JNEUROSCI.12-03-01040.1992
368. Witek-Janusek, L., 1988. Pituitary-adrenal response to bacterial endotoxin in developing rats. *The American journal of physiology* 255, E525-530, 10.1152/ajpendo.1988.255.4.E525
369. Wu, Y., Patchev, A.V., Daniel, G., Almeida, O.F., Spengler, D., 2014. Early-life stress reduces DNA methylation of the *Pomc* gene in male mice. *Endocrinology* 155, 1751-1762, 10.1210/en.2013-1868

370. Xie, L.K., Yang, S.H., 2016. Brain globins in physiology and pathology. *Medical gas research* 6, 154-163, 10.4103/2045-9912.191361
371. Xu, Q., Jiang, M., Gu, S., Wang, F., Yuan, B., 2020. Early Life Stress Induced DNA Methylation of Monoamine Oxidases Leads to Depressive-Like Behavior. *Frontiers in cell and developmental biology* 8, 582247, 10.3389/fcell.2020.582247
372. Xue, X., Shao, S., Wang, W., Shao, F., 2013. Maternal separation induces alterations in reversal learning and brain-derived neurotrophic factor expression in adult rats. *Neuropsychobiology* 68, 243-249, 10.1159/000356188
373. Yang, Y., Cheng, Z., Tang, H., Jiao, H., Sun, X., Cui, Q., Luo, F., Pan, H., Ma, C., Li, B., 2017a. Neonatal Maternal Separation Impairs Prefrontal Cortical Myelination and Cognitive Functions in Rats Through Activation of Wnt Signaling. *Cereb Cortex* 27, 2871-2884, 10.1093/cercor/bhw121
374. Yang, Y., Zhang, Y., Luo, F., Li, B., 2016. Chronic stress regulates NG2(+) cell maturation and myelination in the prefrontal cortex through induction of death receptor 6. *Experimental neurology* 277, 202-214, 10.1016/j.expneurol.2016.01.003
375. Yang, Y.J., Cheng, Z.Y., Tang, H., Jiao, H.F., Sun, X., Cui, Q.Z., Luo, F., Pan, H.L., Ma, C.L., Li, B.M., 2017b. Neonatal Maternal Separation Impairs Prefrontal Cortical Myelination and Cognitive Functions in Rats Through Activation of Wnt Signaling. *Cerebral Cortex* 27, 2871-2884, 10.1093/cercor/bhw121
376. Ye, P., Carson, J., D'Ercole, A.J., 1995. Insulin-like growth factor-I influences the initiation of myelination: studies of the anterior commissure of transgenic mice. *Neuroscience letters* 201, 235-238, 10.1016/0304-3940(95)12194-3
377. Yochum, G.S., Ayer, D.E., 2001. Pf1, a novel PHD zinc finger protein that links the TLE corepressor to the mSin3A-histone deacetylase complex. *Molecular and cellular biology* 21, 4110-4118, 10.1128/MCB.21.13.4110-4118.2001
378. Young, E.A., Altemus, M., 2004. Puberty, ovarian steroids, and stress. *Adolescent Brain Development: Vulnerabilities and Opportunities* 1021, 124-133, 10.1196/annals.1308.013

379. Yu, J.C., Khodadadi, H., Malik, A., Davidson, B., Salles, E., Bhatia, J., Hale, V.L., Baban, B., 2018. Innate Immunity of Neonates and Infants. *Frontiers in immunology* 9, 1759, 10.3389/fimmu.2018.01759
380. Zamberletti, E., Prini, P., Speziali, S., Gabaglio, M., Solinas, M., Parolaro, D., Rubino, T., 2012. Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats. *Neuroscience* 204, 245-257, 10.1016/j.neuroscience.2011.11.038
381. Zhang, L., Hernandez, V.S., Liu, B., Medina, M.P., Nava-Kopp, A.T., Irls, C., Morales, M., 2012. Hypothalamic vasopressin system regulation by maternal separation: its impact on anxiety in rats. *Neuroscience* 215, 135-148, 10.1016/j.neuroscience.2012.03.046
382. Zheng, X., Li, Z., Wang, G., Wang, H., Zhou, Y., Zhao, X., Cheng, C.Y., Qiao, Y., Sun, F., 2021. Sperm epigenetic alterations contribute to inter- and transgenerational effects of paternal exposure to long-term psychological stress via evading offspring embryonic reprogramming. *Cell discovery* 7, 101, 10.1038/s41421-021-00343-5
383. Zhou, S., Hayward, S.D., 2001. Nuclear localization of CBF1 is regulated by interactions with the SMRT corepressor complex. *Molecular and cellular biology* 21, 6222-6232, 10.1128/MCB.21.18.6222-6232.2001
384. Августинович Д.Ф., К.И.Л., Бондарь Н.П., 2005. Выбор «контроля» в экспериментальных исследованиях социальных взаимодействий у мышей. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова*. 91, 1454-1468

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Метрики качества RNA-seq библиотек префронтальной коры взрослых животных, контрольной группы и группы с историей длительного отделения от матерей в детстве, полученные при помощи инструмента Picard CollectRnaSeqMetrics.

Образцы	К 1032	К 113	К 213	К 712	ДО 1023	ДО 613	ДО 723	ДО 922
Число прочтений (млн)	26,71	31,15	32,81	27,49	28,89	32,41	32,75	32,94
% выровненных прочтений	97.47	98.58	97.36	97.46	96.64	98.41	98.54	98.23
% представленности рибосомальной РНК	2.24	0.31	1.48	1.17	2.07	0.32	0.11	0.56
% цепь-специфичных прочтений	98.68	99.16	98.90	98.10	98.84	98.86	98.90	98.76
% дубликации	18.08	17.94	16.84	20.05	20.40	18.70	18.95	16.44

К- образцы животных контрольной группы, ДО- образцы животных с длительным отделением.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Метрики качества ChIP-seq библиотек префронтальной коры взрослых животных, контрольной группы и группы с историей длительного отделения от матерей в детстве.

Образцы	Число прочтений (млн)	% уникально картированных ридов	% дубликации
К_2	9,43	95.01%	12.22%
К_4	9,79	94.38%	15.13%
К_6	9,73	95.71%	15.95%
К_12	10,01	95.27%	15.88%
ДО_24	10,34	94.06%	15.45%
ДО_25	9,73	95.49%	14.72%
ДО_26	10,58	95.69%	13.38%
ДО_27	8,87	95.16%	14.36%

К- образцы животных контрольной группы, ДО- образцы животных с длительным отделением.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Метрики качества RNA-seq библиотек префронтальной коры взрослых животных, контрольной группы и группы с социальным стрессом (СС) и комбинацией стрессов (ДО+СС), полученные при помощи инструмента Picard CollectRnaSeqMetrics.

Образцы	К_204	К_205	К_208	СС_11	СС_14	СС_15	СС_17	ДО+СС_41	ДО+СС_43	ДО+СС_44	ДО+СС_46
Число прочтений (млн)	30,34	18,45	28,53	29,69	33,68	41,39	31,50	39,74	37,47	27,75	20,73
% выровненных прочтений	98%	96%	93%	97%	90%	98%	97%	95%	97%	95%	98%
% представленности рибосомальной РНК	0.41%	0.31%	0.45%	0.40%	0.16%	0.75%	0.34%	0.31%	0.36%	0.28%	0.27%
% цепь-специфичных прочтений	96%	93%	97%	90%	98%	97%	95%	97%	89%	98%	96%
% дубликации	32%	26%	36%	30%	31%	34%	37%	34%	30%	37%	31%

К- образцы животных контрольной группы, СС- образцы животных, подвергнутых хроническому стрессу социальных поражений, ДО+СС – образцы животных, подвергнутых длительному отделению от матерей в ранний постнатальный период и хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Метрики качества ChIP-seq библиотек префронтальной коры взрослых животных, контрольной группы и группы с социальным стрессом (СС) и комбинацией стрессов (ДО+СС).

Образцы	Число прочтений (млн)	% уникально картированных ридов	% дубликации
К_204	30,34	97.59	32.41
К_205	18,45	94.09	25.91
К_208	28,53	96.51	36.49
СС_11	29,69	95.66	30.34
СС_15	41,39	96.17	33.83
СС_17	31,50	96.98	37.02
ДО+СС_41	39,74	95.24	33.76
ДО+СС_43	37,47	94.65	30.35
ДО+СС_44	27,75	95.71	37.29
ДО+СС_46	20,73	97.91	31.09

К- образцы животных контрольной группы, СС- образцы животных, подвергнутых хроническому стрессу социальных поражений, ДО+СС – образцы животных, подвергнутых длительному отделению от матерей в ранний постнатальный период и хроническому стрессу социальных поражений во взрослом возрасте.