

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук

на правах рукописи

Фурсенко Дария Викторовна

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ  
НЕРВНУЮ СИСТЕМУ И ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ

03.03.01 – физиология

Научный руководитель:

доктор биологических наук

А. В. Куликов

Новосибирск

2017

## Оглавление

Введение .....	5
Глава 1. Обзор литературы. Роль фактора некроза опухоли в нервной системе и в регуляции поведения.....	8
1.1. Фактор некроза опухоли.....	8
1.2. Рецепторы TNF.....	9
1.3. Сигнальные пути TNF. ....	11
1.3.1. Неапоптотические сигнальные пути TNFR1. ....	11
1.3.2. Апоптотические сигнальные пути TNFR1.....	13
1.3.3. Трансдукция сигнала через TNFR2. ....	13
1.4. Роль TNF в ЦНС.....	13
1.4.1. TNF и регуляция нейрогенеза. ....	13
1.4.2. TNF и синаптическая пластичность. ....	16
1.4.3 TNF и регуляция состояний сон-бодрствование.....	17
1.4.4. TNF и синдром больного. ....	19
1.5. Роль TNF в патологиях ЦНС. ....	21
1.5.1. TNF и рассеянный склероз. ....	21
1.5.2. TNF и болезнь Паркинсона. ....	21
1.5.3. TNF и болезнь Альцгеймера. ....	22
1.6. TNF и серотониновая система мозга.....	23
1.6.1. Общая характеристика серотониновой системы мозга. ....	23
1.6.2. Серотониновая система и TNF.....	25
1.7. Изучение роли TNF в регуляции нервной системы и поведения с помощью нокаутных животных.....	27
1.7.1. Получение мышей с нокаутом гена <i>Tnf</i> . ....	27
1.7.2. Изучение поведения у мышей с нокаутом гена <i>Tnf</i> . ....	29
1.7.3. Биохимические и морфологические изменения мозга у мышей с нокаутом гена <i>Tnf</i> . ....	32
1.7.4. Новая линия с нокаутом гена <i>Tnf</i> .....	33

Глава 2. Материалы и методы .....	35
2.1. Экспериментальные животные.....	35
2.2. Тестирование поведения в домашней клетке .....	35
2.3. Поведенческие тесты. ....	36
2.3.1. Тест «открытое поле» .....	36
2.3.2. Тест «приподнятый крестообразный лабиринт».....	36
2.3.3. Тест «принудительное плавание».....	37
2.3.5. Тест «щипковая каталепсия».....	37
2.3.6. Тест «водный лабиринт Морриса» .....	37
2.4. Магнитно-резонансная томография.....	38
2.5. Нейрохимические исследования. ....	39
2.5.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	40
2.5.2. Определение концентрации белка методом Бредфорда .....	41
2.6. Статистическая обработка. ....	41
Глава 3. Результаты .....	42
3.1. Суточное потребление пищи и воды у животных КО и WT.....	42
3.2. Влияние нокаута гена <i>Tnf</i> на суточную динамику двигательной активности и сна в домашней клетке у мышей КО и WT.....	42
3.2.1. Двигательная активность.....	42
3.2.2. Сон.....	44
3.3. Поведение мышей КО и WT возраста 2 и 4 месяцев в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «принудительное плавание», «щипковая каталепсия» и «водный лабиринт Морриса». ....	46
3.3.1. Тест «открытое поле». ....	46
3.3.3. Тест «приподнятый крестообразный лабиринт».....	49
3.3.4. Тест «принудительное плавание».....	50
3.3.5. Тест «щипковая каталепсия».....	51
3.3.6. Тест «водный лабиринт Морриса». ....	51

3.4. Влияние нокаута гена <i>Tnf</i> на морфологию головного мозга. Данные магнитно-резонансной томографии. ....	54
3.5. Влияние нокаута гена <i>Tnf</i> на уровень и метаболизм серотонина в мозге. Данные высокоэффективной жидкостной хроматографии. ....	58
Глава 4. Обсуждение результатов .....	59
4.1. Влияние на сон. ....	59
4.2. Влияние нокаута гена <i>Tnf</i> на двигательную активность. ....	60
4.3. Влияние нокаута гена <i>Tnf</i> на тревожность и эмоциональность.....	60
4.4. Влияние на депрессивно-подобное поведение. ....	61
4.5. Влияние нокаута гена <i>Tnf</i> на пространственное обучение и память.....	62
4.6. Влияние на каталепсию. ....	63
4.6. Изменения в серотониновой системе. ....	64
Заключение .....	65
Выводы .....	66
Список используемых сокращений .....	67
Список цитируемой литературы .....	68
Приложение 1.....	89

## Введение

**Актуальность проблемы.** Фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) это важный провоспалительный цитокин, представитель одноименного семейства, описанный в 1975 году как элемент сыворотки крови у стимулированных эндотоксином мышей (Carswell et al., 1975). Несмотря на своё название, полученное за способность вызывать геморрагический некроз трансплантированной в мышь опухоли, использование данного цитокина для лечения рака у людей оказалось неэффективным, поскольку системное введение TNF вызывало ряд тяжелых побочных эффектов у пациентов (Roberts et al., 2011).

В естественных условиях увеличение уровня TNF в организме связано, как правило, с инфекционными заболеваниями и является необходимым элементом для успешного выздоровления организма (Clark, 2007). TNF – это сигнальная молекула, которая участвует в регуляции неспецифического иммунного ответа (Clark, 2007), а также в нейро-иммунном взаимодействии (McCusker & Kelley, 2013). В ответ на инфекционный стимул под влиянием TNF и других цитокинов происходит изменение деятельности нервной системы и поведения: увеличивается сонливость и неподвижность, снижается аппетит, уменьшается количество социальных взаимодействий, повышается бдительность (Dantzer, 2009; Miller & Raison, 2016). Можно предположить, что не только повышение, но и снижение уровня TNF влияют на вышеуказанные формы поведения.

Для изучения данного вопроса удобной моделью являются мыши с нокаутом гена *Tnf*. Хотя линии мышей с нокаутом гена *Tnf* были получены давно (Körner et al., 1997a; Marino et al., 1997; Pasparakis et al., 1996), данные о влиянии нокаута на поведение и нервную систему этих линий крайне разрознены и не позволяют в полной мере оценить масштаб этого влияния (Baune et al., 2008; Camara et al., 2015; Camara et al., 2013; Golan et al., 2004; McAfoose et al., 2009; Yamada et al., 2000). Так, было показано, что у мышей с нокаутом гена *Tnf* с возрастом меняется поведение, но не было проведено прямого сравнения мышей разных возрастов (Camara et al., 2015; Camara et al., 2013). В нескольких работах проводили изучение тревожности, депрессивно-подобного поведения, когнитивных способностей у мышей в разных тестах, но зачастую без указания возраста, что делает сложным сопоставление результатов и их интерпретацию (Baune et al., 2008; Camara et al., 2015; Camara et al., 2013; Golan et al., 2004; McAfoose & Baune, 2009; Yamada et al., 2000). Достаточно скромно изучена биохимия (Camara et al., 2015; Camara et al., 2013; Yamada et al., 2000), и совсем не изучена морфология мозга у нокаутных мышей. Существенным недостатком моделей нокаута, используемых в этих исследованиях, было то, что они были получены методом замещения участка гена *Tnf* на ген устойчивости к

неомицину *neo'*. Однако было показано, что присутствие *neo'* может повлиять на экспрессию близлежащих генов (Gingrich & Hen, 2000; Mortensen, 2006). Рядом с геном *Tnf* находятся гены, кодирующие LT $\alpha$  и LT $\beta$  (Nedospasov et al., 1986), которые также являются представителями семейства TNF, могут связываться с рецепторами TNF (Locksley et al., 2001) и, таким образом, влиять на конечный фенотип мышей.

В начале этого столетия методом Cre/*loxP* рекомбинации, при котором удаляется и участок гена, и ген устойчивости к неомицину (Mortensen, 2006), российскими учеными была получена новая линия с нокаутом гена *Tnf* (Kuprash et al., 2005). Было показано, что данная линия отличается от других нокаутных линий, полученных ранее сниженным уровнем нейтрофилов и лимфоцитов, а также полным отсутствием Пейеровых бляшек (Kuprash et al., 2005). Таким образом, созданная российскими учеными линия с нокаутом гена *Tnf* является более корректной моделью изучения влияния дефицита данного цитокина на поведение и нервную систему мышей, чем ранее полученные нокаутные линии.

**Целью** данного исследования являлось изучение влияния недостатка TNF на поведение, морфологию и серотониновую систему головного мозга, возрастных изменений этих характеристик у созданной российскими учеными линии мышей с нокаутом гена *Tnf*.

Были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Сравнить двигательную активность, потребление пищи и воды, продолжительность сна, а также тревожность, депрессивно-подобное поведение, предрасположенность к каталепсии и способность к пространственному обучению и памяти у мышей с нокаутом гена *Tnf* и дикого типа в возрасте двух и четырех месяцев.
- 2) Изучить морфологические особенности строения мозга у мышей с нокаутом гена *Tnf* в возрасте двух и четырех месяцев.
- 3) Исследовать влияние нокаута гена *Tnf* на серотониновую (5-НТ) систему мозга (уровень и метаболизм 5-НТ) в возрасте четырех месяцев.

**Научная новизна.** В работе впервые было показано, что

- 1) в возрасте двух месяцев около половины мышей с нокаутом гена *Tnf* проявляют реакцию каталептического замирания, в то время как среди нокаутных животных в возрасте четырех месяцев или мышей дикого типа обоих возрастов не было обнаружено ни одного каталептика;
- 2) депрессивно-подобная неподвижность в тесте принудительного плавания менее выражена у мышей с нокаутом гена *Tnf* в возрасте четырех месяцев по сравнению с животными дикого типа;

- 3) размер гипофиза у мышей с нокаутом гена *Tnf* меньше по сравнению с животными дикого типа в возрасте двух, но не в возрасте четырех месяцев;
- 4) мыши с нокаутом гена *Tnf* проводят меньше времени во сне по сравнению с животными дикого типа;
- 5) уровень 5-НТ в коре и гиппокампе мышей с нокаутом гена *Tnf* выше по сравнению с животными дикого типа.

**Теоретическая и научно-практическая ценность работы.** Результаты данной работы вносят вклад в понимание роли фактора некроза опухоли в развитии центральной нервной системы и в регуляции поведения. Кроме того, были впервые оценены нейробиологические и поведенческие характеристики у созданной российскими учеными линии мышей с нокаутом гена фактора некроза опухоли, что является необходимым этапом для составления паспорта данной линии.

**Положения, выносимые на защиту:**

- 1) Нокаут гена *Tnf* не влияет на двигательную активность, потребление пищи и воды, но снижает длительность сна у мышей.
- 2) У четырехмесячных мышей нокаут гена *Tnf* снижает выраженность депрессивно-подобной неподвижности в тесте принудительное плавание, что сопровождается увеличением уровней серотонина в коре и гиппокампе.
- 3) Мыши с нокаутом гена *Tnf* не отличаются по способностям к пространственному обучению и памяти от мышей дикого типа.
- 4) Показана связь между размером гипофиза и проявлением каталепсии. У двухмесячных нокаутных мышей меньший размер гипофиза сопровождается проявлением каталепсии на уровне 46%, в то время как среди мышей дикого типа не было найдено ни одного каталептика. В возрасте четырех месяцев мыши обеих линий не отличались по размеру гипофиза, а уровень каталептиков равнялся нулю как у нокаутных, так и у мышей дикого типа.

**Апробация результатов.** Полученные результаты были представлены и обсуждены на VII Всероссийском конгрессе молодых биологов (Екатеринбург, 2014), 17th Annual Genes, Brain & Behaviour Meeting (Uppsala, 2015), FENS Featured Regional Meeting 2015 (Thessaloniki, 2015)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 работ, из них 3 статьи в рецензируемых отечественных (2) и международных (1) журналах, 3 тезисов на всероссийских (1) и на международных конференциях (2).

## Глава 1. Обзор литературы. Роль фактора некроза опухоли в нервной системе и в регуляции поведения

### 1.1. Фактор некроза опухоли.

Фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) это важный провоспалительный цитокин, представитель одноименного семейства, описанный в 1975 году как элемент сыворотки крови у стимулированных эндотоксином мышей (Carswell et al., 1975). Своё название данный цитокин получил за способность вызывать геморрагический некроз трансплантированной в мышь опухоли (Carswell et al., 1975).

Ген, кодирующий TNF, располагается на хромосоме 6 человека (Nedwin et al., 1985) и хромосоме 17 мыши (Pennica et al., 1985). Он состоит из 4 экзонов и 3 интронов. Почти 80% экзона 4 кодирует секретируемый белок, в то время как экзоны 1 и 2 кодируют сигнальную последовательность (Рисунок 1) (Nedwin et al., 1985).

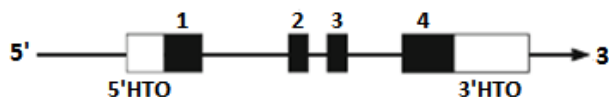


Рисунок 1. Схематическое представление структуры гена TNF (Montgomery & Bowers, 2012). НТО – нетранслируемая область.

В регуляторной области выделяют два региона. В регионе 1 располагаются элементы Sp-1/Erg-1, найдены сайты связывания таких факторов транскрипции как AP-1, p53, c-Fos, c-Jun, ATF-2, а в 3'-нетранслируемой области располагается аденин-урацил богатый элемент (Idriss & Naismith, 2000).

Молекула TNF может существовать в двух физиологически активных формах: tmTNF (transmembrane-associated TNF, трансмембранный TNF) – связанный с плазматической мембраной белок массой 26 кДа, или sTNF (soluble TNF) – растворимый белок массой 17 кДа (Montgomery & Bowers, 2012). Иногда связанную форму TNF называют предшественником или proTNF, а растворимую – зрелой формой TNF. Переход из связанной формы в растворимую происходит под действием матричной металлопротеиназы TACE (TNF $\alpha$  converting enzyme), который отщепляет TNF от мембраны, освобождая его во внеклеточное пространство (Black et al., 1997). Обе формы TNF проявляют свою физиологическую функцию в виде гомотримеров, где каждый отдельный мономер представляет из себя компактный сверток из противоположно направленных  $\beta$ -складок. Мономеры соединяются между собой гидрофобными участками, образуя лиганд в виде инвертированного колокола (Рисунок 2) (Locksley et al., 2001).



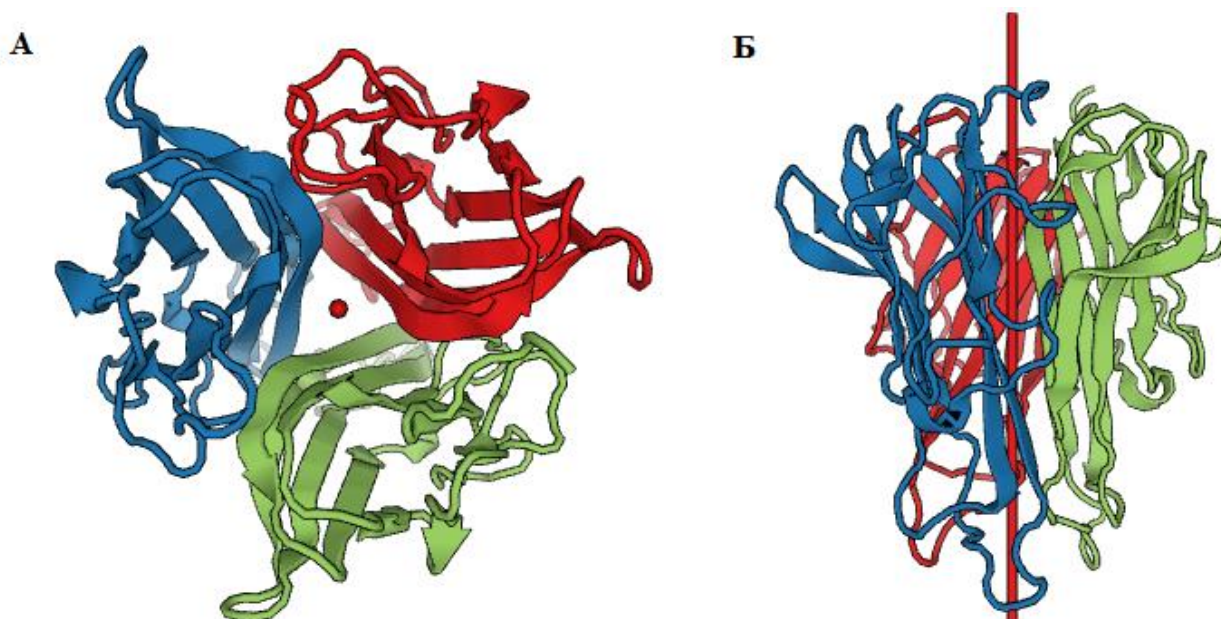


Рисунок 2. Трехмерная структура молекулы TNF. Тример TNF показан сверху (А) и сбоку (Б), каждый мономер выделен своим цветом. Формирующие мономер  $\beta$ -складки скручены по типу «рулета» (иллюстрация с сайта <http://www.rcsb.org/>, модификация Eck & Sprang (Eck & Sprang, 1989)).

В норме TNF в организме экспрессируется в небольших количествах. Но при введении бактериального липополисахарида (ЛПС, фрагмент клеточной стенки бактерий) экспрессия TNF в организме, и в центральной нервной системе (ЦНС) в частности, возрастает (Bette et al., 2003; Copeland et al., 2005; Laflamme & Rivest, 1999; Qin et al., 2008). Основным клеточным источником TNF в организме служат макрофаги на периферии (Bradley, 2008), и микроглия и астроциты в ЦНС (Chung & Benveniste, 1990; Klintworth et al., 2009; Lieberman et al., 1989). Хотя и другие клетки, такие как тучные клетки, Т и В лимфоциты, нейтрофилы, эндотелиальные клетки, гладкая и сердечная мускулатура, фибробласты и остеокласты могут производить TNF, но в меньших количествах (Bradley, 2008).

## 1.2. Рецепторы TNF.

TNF осуществляет свои действия преимущественно через два рецептора: TNFR1 (TNFRSF1A, CD120a, p55) и TNFR2 (TNFRSF1B, CD120b, p75) (Montgomery & Bowers, 2012; Ofengeim & Yuan, 2013; Wajant et al., 2003; Wajant & Scheurich, 2011).

Ген, кодирующий TNFR1, располагается на хромосоме 12 человека (Baker et al., 1991) и хромосоме 6 мыши (Goodwin et al., 1991), а кодирующий TNFR2 – хромосоме 1 человека (Baker et al., 1991) и хромосоме 4 мыши (Goodwin et al., 1991). Рецепторы TNF имеют только 28% гомологии, которая в основном приходится на богатый цистеином внеклеточный домен, связывающий TNF (Oppenheim et al., 2001). В условиях отсутствия

лиганда, богатые цистеином регионы участвуют в гомофильном взаимодействии рецепторных молекул с образованием гомомультимеризованных комплексов, которые вероятно препятствуют спонтанной активации рецептора (Chan et al., 2000). В комплексе лиганд-рецептор, тример TNF с трех сторон окружен мономерами TNFR (Рисунок 3) (Locksley et al., 2001).

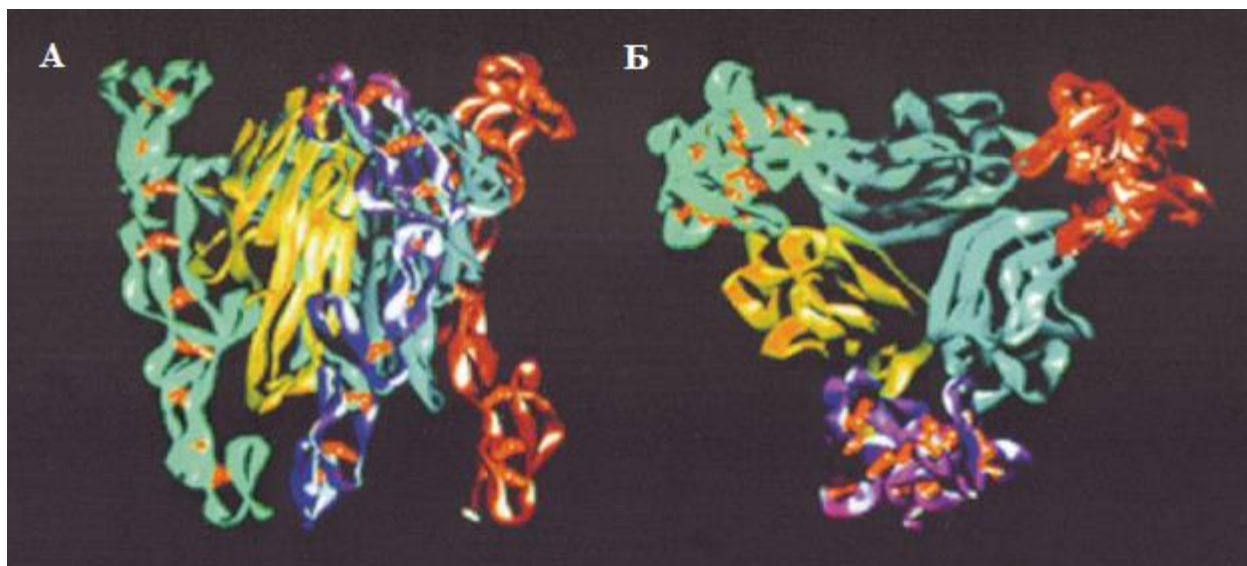


Рисунок 3. Структура комплекса TNF/TNFR на примере комплекса LT $\alpha$ /TNFR1 (Locksley et al., 2001). Цепи рецептора окрашены в зеленый, красный и фиолетовый. А) Вид «сбоку». Б) Вид «сверху».

Существенное структурное различие рецепторов TNF заключается в наличии у TNFR1 во внутриклеточной части так называемого домена смерти (death domain, DD), и отсутствие его у TNFR2, что приводит к отличиям во вторичных посредниках, привлекаемых рецепторами (Wajant et al., 2003).

Функциональная разница между рецепторами заключается в том, что TNFR1 одинаково хорошо связывает как sTNF, так и tmTNF, в то время как TNFR2 обладает большим сродством к tmTNF (Grell et al., 1995). Сами рецепторы, в результате протеолитической активности TACE, могут так же переходить в растворимое состояние, сохраняя при этом способность связывать TNF, тем самым ограничивая передачу сигнала через связанные с мембраной рецепторы (Ermer et al., 2003).

В организме регуляция и паттерн экспрессии рецепторов TNF различается. TNFR1 экспрессируется постоянно большинством типов клеток, за исключением эритроцитов и неактивированных Т-клеток (Fiers, 1991), в мозге мышей экспрессия TNFR1 обнаружена в ряде структур, таких как кора, гиппокамп и мозжечок (Bette et al., 2003). TNFR2 не экспрессируется в организме на постоянной основе, а активируется воспалительными стимулами (Kalthoff et al., 1993; Winzen et al., 1993), кроме того область его экспрессии ограничена клетками гематopoэтической линии, включая клетки микроглии и

эндотелиальные (Santee & Owen-Schaub, 1996). Такое различие можно объяснить тем, что в регуляторном регионе TNFR1 имеются черты промоторов генов домашнего хозяйства (отсутствие TATA и CAAT (Rothe et al., 1993)), а у TNFR2 сAMP связывающий элемент и участки связывания таких транскрипционных факторов как NF-κB, AP-1, IRF-1 и GAS (Santee & Owen-Schaub, 1996).

Существование связанной и растворимой формы TNF и его рецепторов, различная аффинность рецепторов к разным формам TNF, отличия в паттерне экспрессии рецепторов, расширяет область возможных клеточных ответов на увеличение уровня TNF и обеспечивают тонкую настройку организма в зависимости от условий.

### 1.3. Сигнальные пути TNF.

Рецепторы TNF не имеют собственной ферментативной активности, и действуют через внутриклеточную агрегацию белковых адапторов (Montgomery & Bowers, 2012; Ofengeim & Yuan, 2013; Wajant et al., 2003; Wajant & Scheurich, 2011). На данный момент, о трансдукции сигнала от TNFR1 известно гораздо больше, чем от TNFR2 (Рисунок 4).

#### 1.3.1. Неапоптотические сигнальные пути TNFR1.

При присоединении TNF к TNFR1, происходят конформационные изменения рецептора, после которых к его внутриклеточной части через DD присоединяются белки TRADD (TNF-receptor associated death domain, присоединенный к рецептору TNF через DD) и RIP1 (receptor-interacting protein 1, взаимодействующий с рецептором белок 1), относящийся к серин-треониновым киназам (Chan, 2007; Degterev et al., 2008; Legler et al., 2003). Как TRADD, так и RIP1 имеют на своем С-конце собственный домен смерти, через который они связываются с TNFR1 (Devin et al., 2000). Затем к данному комплексу присоединяется TRAF2 (TNF receptor associated factor 2, связывающий рецептор TNF фактор 2) (Wajant et al., 2003). TRAF2 образует стабильный гомотримерный комплекс, который взаимодействует с TRADD. TRAF2 может напрямую взаимодействовать с рецепторами семейства TNF, у которых отсутствует DD, например с TNFR2, однако сила такого взаимодействия будет гораздо слабее, чем взаимодействие TRADD-TRAF2 (Wajant & Scheurich, 2011). Далее TRAF2 формирует комплекс с cIAP1 и cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis protein, клеточные ингибиторы апоптоза). Такой комплекс, состоящий из TRADD, RIP1, TRAF2 и cIAP1 и 2 называют «комплексом I» (Рисунок 4) (Ofengeim & Yuan, 2013).

В передаче сигнала через TNFR1 большую роль играет убиквитинирование (Wajant & Scheurich, 2011). Формирование комплекса I на TNFR1 запускает опосредованное cIAP полиубиквитинирование RIP1 и TRAF2 (линейно или по Lys63) и привлечение еще одного

убиквитинирующего комплекса – LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex, линейный убиквитинирующий комплекс), который усиливает убиквитинирование сигнального комплекса и стабилизирует его (Rahighi et al., 2009). К TRAF2 через свою убиквитин связывающую субъединицу присоединяется киназа IκB (IKK), а RIP1 взаимодействует с комплексом из TAK1 (transforming growth factor-β-activated kinase 1, киназа активирующая трансформирующий ростовой фактор β), TAB2 и TAB3 (TAK1-binding proteins, TAK1 связывающие белки). RIP1 и TAK1 активируют IKK, который в свою очередь фосфорилирует IκB (inhibitor of kappa B), вызывая его протеосомальную деградацию и освобождая из его состава NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, ядерный фактор «каппа-би»), который перемещается в ядро и запускает транскрипцию (Xia et al., 2009) (Рисунок 4).

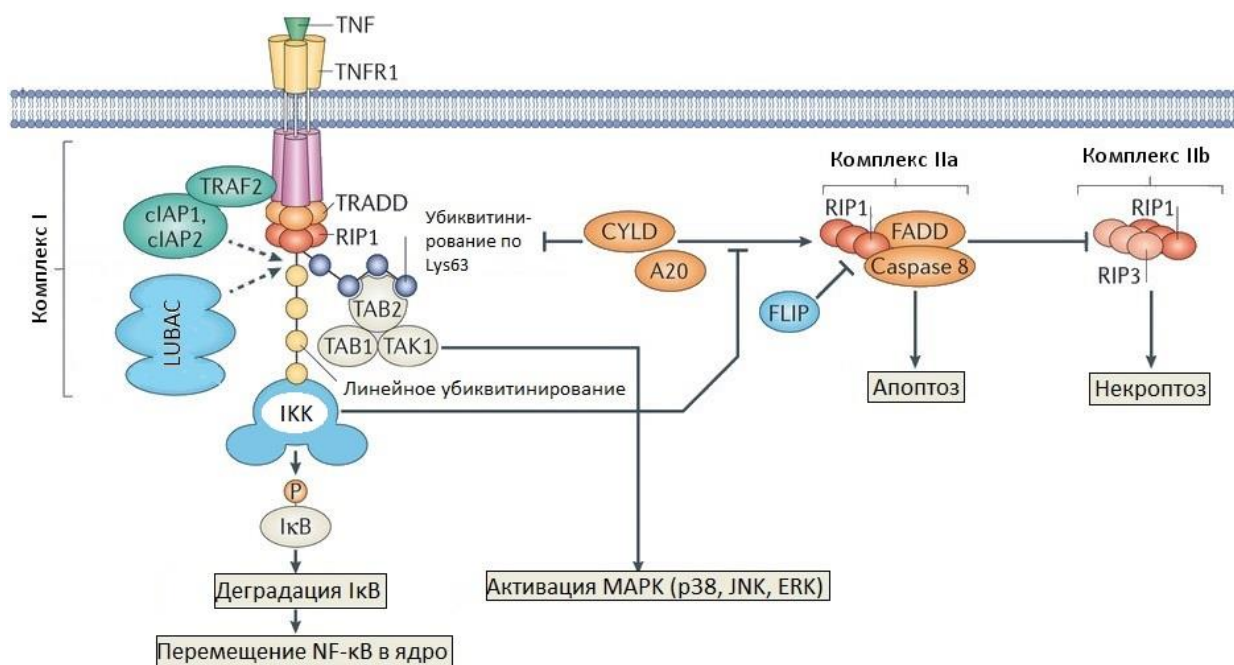


Рисунок 4. Трансдукция сигнала от TNFR1. Модификация Ofengeim & Yuan, 2013 (Ofengeim & Yuan, 2013). Пояснения в тексте.

Кроме того было показано, что TNF вызывает активацию JNK (c-Jun N-terminal kinases, N-концевая киназа c-Jun) и p38 (Wajant et al., 2003), однако эти пути изучены не так хорошо, как NFκB путь. JNK активируется MKK4 (mitogen-activated protein kinase kinase, митогенактивируемая протеинкиназа киназа) и MKK7, p38 – MKK3, MKK6. Их активацию обеспечивает ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1, регулирующая апоптотический сигнал киназа 1), TAK1 и некоторые другие MAP3K (mitogen-activated protein kinase kinase, митогенактивируемая протеинкиназа киназа киназа), которые в свою очередь активируются TRAF2 и TRAF6 (Wajant et al., 2003).

### 1.3.2. Апоптотические сигнальные пути TNFR1.

Отщепление полиубиквитиновых цепей от RIP1 убиквитин-модифицирующим белком A20 или деубиквитирующим ферментом цилиндроматозисом (cylindromatosis, CYLD) приводит к диссоциации RIP1 от комплекса I (Wertz et al., 2004; Wright et al., 2007). Далее, либо RIP1 киназа может быть опять убиквитинирована, но уже по Lys48, что приведет к её деградации, либо неубиквитинированная RIP1 может образовать в цитозоле «комплекс Па» с TRADD, FADD (Fas-associated protein death domain, присоединенный к Fas через DD) и гомодимером и/или гетеродимером про-каспазы 8 и cFLIP<sub>L</sub>, что приведет к апоптозу (Brenner et al., 2015; Ofengeim & Yuan, 2013). В цитозоле RIP1 так же может связаться с RIP3 киназой, про-каспазой 8 и cFLIP<sub>L</sub> – «комплекс Пб», что приведет к некроптозу (Рисунок 4) (Brenner et al., 2015; Ofengeim & Yuan, 2013).

### 1.3.3. Трансдукция сигнала через TNFR2.

Внутриклеточный участок TNFR2 не имеет DD, но может напрямую взаимодействовать с TRAF2 (Wajant & Scheurich, 2011) и вызывать активацию тех же путей, что и TNFR1 (Montgomery & Bowers, 2012), что обеспечивает пересечение внутриклеточных каскадов реакций этих рецепторов. С одной стороны, было показано, что образование комплекса TNF/TNFR2 приводит к активации нейропротекторных механизмов (Arnett et al., 2001; Fontaine et al., 2002). С другой стороны, активация TNFR2 может опосредовано приводить к апоптозу, через уменьшение доступности TRAF2 для TNFR1 и, следовательно, через изменение баланса внутриклеточных посредников в сторону образования апоптотических комплексов Па и Пб (Wajant et al., 2003). Изменение во взаимодействии двух рецепторов может приводить к значительным нарушениям в функционировании организма с одной стороны, и открывает широкие возможности для медикаментозного регулирования с другой.

## 1.4. Роль TNF в ЦНС.

### 1.4.1. TNF и регуляция нейрогенеза.

Сигнал, передаваемый фактором некроза опухоли в клетку, в зависимости от типа активируемого рецептора и от условий, в которых находится клетка, может приводить к активации как апоптотических процессов, так и процессов, направленные на поддержание жизнедеятельности клетки. Известно, что при нормальном развитии организма процессы формирования и гибели клеток тесно сопряжены и активно регулируются. В мозге правильное соотношение поддерживающих и про-апоптотических сигналов обеспечивают нормальное формирование структуры мозга и нейронных связей (Roth & D'Sa, 2001).

Например, мотонейроны крыс вступают на этап программируемой клеточной гибели между двенадцатым (E12) и тринадцатым (E13) днём эмбрионального развития (E10.5 – E11.5 у мышей) (Sedel, 2004). На изолированных сомитах эмбрионов крыс было показано, что макрофаги, находящиеся в окружающей нейроны мезенхиме, экспрессируют TNF, а клетки мотонейронов экспрессируют TNFR1. Данное изменение в экспрессии наблюдается только на E12, но не на E11.5 и не на E13, то есть ровно в тот момент, когда мотонейроны вступают на путь апоптоза. То, что именно взаимодействие TNF/TNFR1 запускает гибель мотонейронов было показано на нокаутных мышах. У мышей с нокаутом *Tnf* или гена, кодирующего TNFR1, мотонейроны изолированных сомитов эмбрионов не подвергаются апоптозу на E11, что соответствует стадии E12 у крыс (Sedel, 2004). Данная работа иллюстрирует, что TNF и его рецепторы не только участвуют в запуске программируемой клеточной гибели нейронов, но и имеют строгую пространственную и временную регуляцию.

Действительно, в работах *in vitro* на культурах клеток было показано, что в зависимости от стадии развития, типа клеток, а так же от дозы, TNF может либо приводить к апоптозу, либо запускать процессы дифференцировки. Например, было показано, что TNF в концентрации 20 нг/мл вызывал гибель клеток линии HiB5, созданной из гиппокампальных клеток крыс (E16) (Cacci et al., 2005). Аналогично, TNF в концентрации от 3 нг/мл вызывает апоптоз в культуре клеток септо-гиппокампальных нейронов (крысы, E18) (Zhao et al., 2001), однако в другой работе на гиппокампальных клетках крыс, полученной на той же стадии развития (E18), не было обнаружено влияния TNF в концентрациях 1-100 нг/мл на количество клеток в опытной и контрольной группе (Keohane et al., 2010). Но поскольку не было проведено исследования на апоптотические маркеры, то данный результат может служить лишь косвенным доказательством отсутствия апоптоза в данных условиях (Keohane et al., 2010). Между тем в этой же работе авторы показали, что добавление TNF в концентрациях 10-100 нг/мл усиливает дифференциацию нейрональных стволовых клеток в клетки астроцитоидного ряда (Keohane et al., 2010). Усиление дифференциации нейрональных предшественников было так же показано на культуре клеток субвентрикулярной зоны, полученной от новорожденных мышат (первый-третий день постнатального развития, P1-P3), где небольшая концентрация TNF (1 нг/мл) через активацию TNFR1 усиливала дифференциацию (Bernardino et al., 2008), но более высокие концентрации приводили к апоптозу (Bernardino et al., 2008; Wong et al., 2004). Было показано, что разные области мозга различаются по чувствительности к TNF. Так, в культуре гранулярных клеток мозжечка и клеток Пуркинье мозжечка (мышь P1, P5 и P8), культивирование как с высокими, так и с низкими концентрациями TNF не приводило к

гибели клеток. Влияние на клетки данной области было обнаружено только на стадии E16 развития мышат, где TNF в концентрации 10 нг/мл увеличивал выживаемость клеток, по сравнению с контролем (Oldreive & Doherty, 2010). Возрастное изменение влияния TNF на регуляцию жизнедеятельности клеток было показано на культуре дофаминергических нейронов полученной из вентральной области среднего мозга на разных стадиях эмбрионального развития мышей. Было показано, что на стадии E12.5 фактор некроза опухоли в концентрации 20 нг/мл ускоряет дифференциацию дофаминергических нейронов, в то время как на стадии E14 и E16 TNF уже в концентрации 0.8 нг/мл вызывает их гибель (Doherty, 2007).

Помимо изолированного участия TNF в жизнедеятельности клеток, было показано взаимодействие TNF и NGF (nerve growth factor, фактор роста нервов) в регуляции данного процесса. Так, NGF необходим для выживания сенсорных и симпатических нейронов на стадии E16 развития мышинных эмбрионов *in vitro* (Barker et al., 2001). Содержание культур данных клеток в среде с дефицитом NGF приводило к гибели около 80% клеток за 48 часов, но добавление антител к TNF или TNFR1 увеличивало количество выживших нейронов до 30-40% от исходного количества, что говорит о вовлечении TNF в процессы клеточной гибели в данных условиях (Barker et al., 2001). Обратная зависимость между уровнем TNF и NGF была показана в работах *in vivo*. Так, у мышей с полным нокаутом гена *Tnf* уровень NGF в гиппокампе был повышен в первые недели постнатального развития (Golan et al., 2004), а у мышей с генетически увеличенной экспрессией TNF наоборот – снижен (Fiore et al., 2000).

Фактор некроза опухоли участвует в регуляции нейрогенеза не только в эмбриональном и раннем постнатальном возрасте, но и во взрослом организме. Однако данные о его роли противоречивы. С одной стороны было показано, что введение взрослым крысам антител к TNF после ишемии мозга уменьшало нейрогенез в стриатуме и гиппокампе, что говорит о положительном влиянии TNF на формирование нейронов (Heldmann et al., 2005). В другой работе, у взрослых мышей с нокаутом гена *Tnf* не было обнаружено улучшения или ухудшения нейрогенеза по сравнению с контрольными мышами, но было показано, что нокаут гена TNFR1 приводил к облегчению пролиферации и формирования нейробластов в субвентрикулярной зоне, что говорит о негативной регуляции нейрогенеза первым рецептором (Iosif et al., 2006). Связь TNF с нарушением нейрогенеза показана и на других моделях различных патологий, о чем будет сказано далее.

#### 1.4.2. TNF и синаптическая пластичность.

Понятие синаптической пластичности отражает способность к изменению силы и/или эффективности синаптической передачи в зависимости от состояния активности синапса, что считается главным механизмом объединения временного опыта в устойчивый след памяти (Citri & Malenka, 2008). Два основных механизма вовлечены в процесс долговременной пластичности: (1) долговременная потенция (long-term potentiation, LTP) и долговременная депрессия (long-term depression, LTD), которые обеспечивают соответственно длительное (несколько часов) облегчение или подавление передачи сигнала через синапс; (2) гомеостатический синаптический скейлинг (homeostatic synaptic scaling), обеспечивающий увеличение или уменьшение силы всех синапсов целого нейрона (Stellwagen & Malenka, 2006; Turrigiano, 2008).

Основную роль в этих процессах играют рецепторы глутамата, в частности рецептор  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA) (Stellwagen & Malenka, 2006; Turrigiano, 2008). Было показано, что наномолярные концентрации TNF (0.6-60 nM) могут увеличивать количество AMPAR на поверхности гиппокампальных (Beattie et al., 2002; Stellwagen et al., 2005; Stellwagen & Malenka, 2006) и кортикальных (He et al., 2012) нейронов. Основную роль в данном процессе играет соединение лиганда с TNFR1, в то время как передача сигнала через TNFR2 видимо не участвует в регуляции AMPAR (He et al., 2012; Stellwagen et al., 2005). Кроме того, было показано, что в дальнейший каскад реакций вовлечена активация фосфоинозитол-3-киназ (Stellwagen et al., 2005). Соединение глутамата со своими рецепторами приводит к генерации возбуждающих постсинаптических потенциалов, которые, при достаточном их количестве, могут передать возбуждение на соседние клетки (Purves et al., 2001). Но помимо рецепторов глутамата на поверхности нейронов имеются рецепторы гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), активация которых приводит к генерации тормозящих постсинаптических потенциалов, способных тормозить или прерывать передачу сигнала к другим клеткам (Purves et al., 2001). Интересно, что фактор некроза опухоли, помимо увеличения количества AMPAR на поверхности нейрона, вызывает эндоцитоз рецептора ГАМК<sub>A</sub>, что может приводить к облегчению передачи сигнала нейроном (Stellwagen et al., 2005).

Известно, что увеличение AMPAR на поверхность синапса происходит при генерации LTP, а при LTD наоборот, происходит его интернализация (Lüscher & Malenka, 2012), соответственно можно было бы ожидать, что TNF будет приводить к усилению LTP. Однако было показано, что острое воздействие (<15 минут) высоких концентраций TNF не оказывало влияния на долговременную потенцию (Stellwagen & Malenka, 2006; Tancredi et al., 1992), а инкубирование срезов гиппокампа в среде с высокими концентрациями TNF



более 15 минут (в разных работах от 15 минут до 3 часов) приводило к ингибированию LTP (Butler et al., 2004; Cunningham et al., 1996; Tancredi et al., 1992). Нокаут TNFR1 не оказывал влияния на LTP (Albensi & Mattson, 2000; Stellwagen & Malenka, 2006), однако нокаут обоих рецепторов TNF приводил к ингибированию LTD (Albensi & Mattson, 2000). Нокаут гена *Tnf* так же не оказывал влияния на проявление LTP на срезах гиппокампа (Santello et al., 2011; Stellwagen & Malenka, 2006) и зрительной коры (Kaneko et al., 2008), однако приводил к нарушению гомеостатического скейлинга. При длительной блокаде активности нейрона, TNF обеспечивает увеличение AMPAR на поверхности клетки, что приводит синапс в более легко возбудимое состояние (Kaneko et al., 2008; Stellwagen & Malenka, 2006).

Таким образом TNF обладает модулирующим действием на синаптическую передачу, увеличивая экзоцитоз AMPAR и эндоцитоз ГАМК<sub>A</sub>, а так же участвуя в механизме гомеостатической пластичности.

#### *1.4.3 TNF и регуляция состояний сон-бодрствование.*

У наземных млекопитающих сон состоит из двух фаз: медленный сон (NREMS, non-rapid eye movement sleep) и быстрый (REMS, rapid eye movement sleep) (Zepelin et al., 2005). Для состояния медленного сна характерно наличие высокоамплитудных низкочастотных волн (дельта-ритм) в комплексе со спонтанным сигма-ритмом (высокочастотные с нарастающей амплитудой), фиксируемых с помощью электроэнцефалограммы (ЭЭГ), и общее подавление мышечной активности. В фазе быстрого сна наблюдается асинхронная низкоамплитудная активность на ЭЭГ в сочетании с движениями глаз, подергиванием конечностями и постуральной атонией (Hobson, 1969). Комбинация этих двух фаз (NREMS-REMS или REMS-NREMS) составляет один цикл сна, а непрерывная смена нескольких циклов сна формирует эпизод сна. В зависимости от количества эпизодов выделяют монофазную (один эпизод сна) и полифазную (два и более эпизодов) структуру сна (Zepelin et al., 2005). Для человека характерна монофазная структура сна, большая часть которого приходится на темное время суток (Hobson, 1969), а для мышей и крыс – полифазная, где примерно две трети эпизодов сна приходится на светлое время суток (Twyver Van, 1969).

Регуляция сна осуществляется нервным и гуморальным путем. Нервная регуляция организована по принципу выключателя, где активность структур, отвечающих за состояние бодрствования, подавляется во время сна активностью структур, отвечающих за состояние покоя (McGinty & Szymusiak, 2000; Saper et al., 2001). Структуры, отвечающие за бодрствование организованы в два восходящих пути. Первый путь начинается в холинергических ядрах ствола мозга – ножкомостовом и латеродорсальном ядре покрывки (pedunculopontine и laterodorsal tegmental nucleus), и направляется в таламус, где происходит

активация релейных нейронов и ретикулярных ядер, участвующих в таламокортикальной передаче (Saper et al., 2001). Второй путь состоит из норадренергических нейронов голубого пятна (*locus coeruleus*), серотонинергических дорсального и медиального ядра шва (*dorsal и median raphe nuclei*), дофаминергических нейронов вентрального центрального серого вещества (*ventral periaqueductal grey matter*) и гистаминовых бугорнососцевидных ядер (*tuberomammillary nucleus*), которые посылают свои проекции в латеральный гипоталамус, базальный передний мозг и кору головного мозга (Saper et al., 2001). Перечисленные ядра наиболее активны во время бодрствования и REMS, во время NREMS их активность снижается (Fuller et al., 2006). Снижение их активности во время NREMS осуществляется тормозящими ГАМКергическими нейронами вентролатеральных преоптических ядер (ВЛПЯ, *ventrolateral preoptic nucleus*), которые иннервируют все вышеперечисленные ядра (Sherin et al., 1998). В свою очередь ВЛПЯ находится под ингибирующим влиянием проекций норадренергических нейронов голубого пятна и серотонинергических нейронов медиального ядра шва (Schwartz & Roth, 2008).

Гуморальная регуляция сна осуществляется с помощью различных веществ, от низкомолекулярных с коротким полупериодом жизни (аденозин, оксид азота), до долгоживущих пептидов (релизинг фактор гормона роста, орексин) и белков, включая цитокины (Davis & Krueger, 2012). Было показано, что внутрижелудочковое (*icv*, *intracerebroventricular*), внутривенное (*iv*, *intravenous*) или внутрибрюшинное (*ip*, *intrapерitoneal*) введение TNF увеличивает длительность NREMS у кроликов (Shoham et al., 1987), мышей (Fang et al., 1997), крыс (Kubota et al., 2002) и овец (Dickstein et al., 1999). Было показано, что *ip* введение TNF дозозависимо увеличивает количество времени, проведенного во сне, где доза 0.3 мкг/мышь не оказывает существенного влияния на продолжительность сна животных, а дозы 1.0 мкг/мышь и 3.0 мкг/мышь увеличивают общую продолжительность NREMS, но в основном за счет увеличения их количества, а не длительности (Fang et al., 1997). Похожий дозозависимый эффект на увеличение NREMS был показан для *icv* введения TNF крысам в преоптическую область переднего гипоталамуса (Kubota et al., 2002). Влияние TNF на REMS не столь ярко выраженное, поскольку проявляется только при введении больших доз TNF (Fang et al., 1997; Kubota et al., 2001; Zielinski et al., 2013), и зависит от места введения. Так, не было обнаружено изменений в длительности REMS при *icv* введении в преоптическую область переднего гипоталамуса (Kubota et al., 2002) или при локальном нанесении в область соматосенсорной коры (Yoshida et al., 2004).

Об участии TNF в регуляции сна свидетельствуют так же работы, связанные с ингибированием или нарушением действия фактора некроза опухоли в мозге. Так, было

показано введение антител к TNF (Takahashi et al., 1995a), растворимых рецепторов TNF (Takahashi et al., 1995b) или их фрагментов (Kubota et al., 2002; Takahashi et al., 1996) уменьшало длительность NREMS у крыс и кроликов. Кроме того, нокаут гена, кодирующего TNFR1, так же приводил к уменьшению времени NREMS и REMS (Fang et al., 1997). Однако в другой работе, более поздней, нокаут TNFR1 не оказывал влияния на длительность сна, хотя у мышей с нокаутом TNF/LT $\alpha$  и TNFR2 длительность REMS, но не NREMS была меньше, по сравнению с контролем (Deboer et al., 2002). В данной работе различия с предыдущими данными касательно роли TNFR1 в регуляции сна объяснили различиями в получении нокаутированных мышей (Deboer et al., 2002).

Было показано, что у людей с различными заболеваниями, такими как апноэ во сне (Imagawa et al., 2004), хроническая усталость (Moss et al., 1999), бессонница (Vgontzas et al., 2002), синдром приобретенного иммунодефицита (Darko et al., 1995), ревматоидный артрит (Taylor-Gjevre et al., 2011) и анкилозирующий спондилоартрит (Karadağ et al., 2012) усиленное ощущение сонливости сопровождается повышенным уровнем TNF в плазме крови. Лекарства же, ингибирующие действие TNF, уменьшают сонливость и усталость, связанную с этими заболеваниями (Franklin, 1999; Karadağ et al., 2012; Taylor-Gjevre et al., 2011; Vgontzas et al., 2004).

Еще одним доказательством участия TNF в регуляции состояния сон-бодрствование является изменение его уровня в мозге в зависимости от времени суток. Было показано, что уровень мРНК и белка TNF у крыс в различных структурах мозга, в том числе в гипоталамусе, ниже в темное время суток, когда животное большую часть времени активно, и выше в светлое время суток, на которое приходится больше всего эпизодов сна (Bredow et al., 1997; Floyd & Krueger, 1997).

Таким образом, фактор некроза опухоли является сомногенным агентом, чьи высокие уровни связаны с увеличением NREMS у животных, а ингибирование с его уменьшением.

#### *1.4.4. TNF и поведение больного.*

При проникновении в организм вирусной или бактериальной инфекции, помимо активации иммунной системы, происходит изменения деятельности центральной нервной системы, что приводит к изменению поведения животных (Dantzer, 2009). Данный поведенческий ответ включает в себя комплекс симптомов, таких как лихорадка, слабость, сонливость, боль в конечностях, снижение аппетита и социальной активности, которые объединяют понятием «поведение больного» (sickness behavior) (Kelley & McCusker, 2014). В основном на изменение деятельности ЦНС во время инфекции оказывают влияние

провоспалительные цитокины, которые вырабатываются в очаге заражения: IL-1, IL-6 и TNF (Dantzer, 2009). В лабораторных условиях, поведение больного можно вызывать у животных введением ЛПС, который индуцирует синтез цитокинов, либо непосредственным введением IL-1, IL-6 или TNF (Bluthé et al., 2000a; Bluthé et al., 2000b; Palin et al., 2007; Palin et al., 2008). В частности, было показано, что внутрижелудочковое введение TNF как мышам дикого типа, так и мышам с нокаутом TNFR2, приводило к увеличению неподвижности и уменьшению контактов с ювенильным самцом, что соответствует проявлению слабости и снижению социальной активности (Palin et al., 2007). Молекулярный механизм действия TNF в индукции признаков поведения больного вероятно включает передачу сигнала через TNFR1 (Palin et al., 2007) и активацию JNK (Palin et al., 2008).

Поведение больного, в рамках физиологической нормы, способствует выживанию и выздоровлению организма (Dantzer, 2009). Однако в условиях хронической активации иммунной системы, перечисленные выше симптомы становятся характеристикой патологического состояния, в частности депрессивного состояния (Miller & Raison, 2016). Действительно, у больных раком, проходящим цитокиновую терапию (IL-2, IFN- $\alpha$ ), на ранних стадиях лечения отмечают симптомы, характерные для синдрома больного, которые на поздних стадиях переходят в изменение настроения, характеризующееся депрессией, грустью и суицидальными мыслями (Capuron et al., 2004). Что касается лабораторных исследований, то введение мышам TNF вызывало увеличение времени неподвижности в тесте принудительного плавания и в тесте подвешивания за хвост, но введение блокаторов TNF или антидепрессантов отменяло данный эффект, что говорит о депрессантном действии TNF (Kaster et al., 2012). В согласии с этим, нарушение сигнальных путей TNF нокаутом первого или второго рецепторов вызывало уменьшение времени неподвижности в тесте принудительного плавания (Kaster et al., 2012; Simen et al., 2006). Что касается влияния нокаута самого TNF, то тут данные противоречивы. В то время, как в одних работах дефицит TNF уменьшал проявление депрессивно-подобного состояния (Camara et al., 2013), в других он не оказывал влияния (Camara et al., 2015; Duseja et al., 2015), или даже приводил к увеличению (Yamada et al., 2000) (подробнее о поведении нокаутов и возможных причинах различий в результатах рассказано в главе 1.7).

Таким образом, TNF является одним из цитокинов, обуславливающим синдром больного в пределах физиологической нормы, однако при чрезмерной или, наоборот, недостаточной экспрессии он может приводить к патологическим состояниям.

## **1.5. Роль TNF в патологиях ЦНС.**

### *1.5.1. TNF и рассеянный склероз.*

Рассеянный склероз (РС) это хроническое аутоиммунное заболевание которое характеризуется потерей миелиновой оболочки нервных волокон ЦНС (Lassmann et al., 2007). У пациентов с РС был обнаружен высокий уровень TNF в спинномозговой жидкости (СМЖ), коррелирующий с интенсивностью заболевания. Но в сыворотке крови у пациентов уровень TNF не отличался от нормы, что свидетельствует о его локальной продукции клетками спинного мозга (Sharief & Hentges, 1991).

Участие TNF в патологии РС было показано и на животных моделях. Так, у мышей с увеличенной экспрессией TNF наблюдались значительные очаги демиелинизации и инфильтрация Т-лимфоцитов, что приводило к ранней смерти животных. Однако введение антител к TNF возвращало этим мышам нормальный фенотип (Probert et al., 1995).

Одним из способов изучения РС на мышах является экспериментальная модель аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) (Constantinescu et al., 2011). Иммунизация мышей белками ЦНС, такими как гликопротеин миелина олигодендроцитов (myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG) вызывает воспалительный ответ и инфильтрацию иммунных клеток в ткани мозга, что приводит к формированию очагов демиелинизации и последующим клиническим симптомам (Constantinescu et al., 2011). Введение таким мышам блокаторов TNF облегчало состояние заболевания (Vaker et al., 1994). А у мышей с нокаутом по TNF начало ЭАЭ было отсрочено по сравнению с мышами дикого типа, при этом, после возникновения заболевания, тяжесть и длительность его не отличалась у мышей нокаутной линии и дикого типа, что говорит о том, что TNF участвует в инициации ЭАЭ, но не оказывает влияния на дальнейшее протекание заболевания (Körner et al., 1997b).

### *1.5.2. TNF и болезнь Паркинсона.*

Болезнь Паркинсона (БП) – это хроническое возрастное заболевание, которое характеризуется прогрессирующими моторными нарушениями, такими как мышечная ригидность, тремор, гипокинезия, постуральная неустойчивость (Samii et al., 2004). Для данной болезни характерна постепенная гибель дофаминовых нейронов в черной субстанции головного мозга (Samii et al., 2004). Было показано, что воспалительный процесс играет существенную роль в протекании данного заболевания (Gerhard et al., 2006; Imamura et al., 2003).

У пациентов с БП уровень TNF повышен в спинномозговой жидкости (СМЖ) и в стриатуме (Voka et al., 1994; Mogi et al., 1994). Существенным доказательством того, что TNF вовлечен в инициацию и развитие данного заболевания является то, что полиморфизм

в промоторе гена TNF изменяет транскрипционную активность и приводит к увеличению продукции TNF в группе людей с признаками раннего БП по сравнению с больными с поздним началом БП и по сравнению с контролем (Nishimura et al., 2001). Другой полиморфизм в промоторе был связан с повышенным уровнем TNF в крови и был широко представлен у больных с ранним началом спорадической формы БП (Wahner et al., 2007).

Для моделирования БП на животных используют введение нейротоксинов, МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) или 6-ОНДА (6-гидроксидофамин), которые вызывают дегенерацию нигростриатного пути, а также вызывают увеличение уровня TNF в стриатуме и черной субстанции (Simola et al., 2007; Smeyne & Jackson-Lewis, 2005). У мышей с нокаутом TNFR1 и TNFR2 введение МРТР приводило к более серьезным потерям дофаминовых нейронов, чем нокаут только одного из рецепторов, что говорит о положительном влиянии TNF в БП (Rousselet et al., 2002). С другой стороны, у мышей с нокаутом обоих рецепторов TNF активация микроглии в стриатуме была снижена после введения МРТР, однако в гиппокампе наблюдались значительные повреждения нейронов (Sriram et al., 2002; Sriram et al., 2006). Введение 6-ОНДА 2-3 месячным животным не приводило к дегенерации нигростриатного пути у мышей с низким уровнем экспрессии TNF, но вызывало значительную потерю нейронов у мышей с повышенной его экспрессией (Chertoff et al., 2011). Таким образом роль TNF в патогенезе БП может быть как негативной, так и положительной в зависимости от региона мозга и от уровня экспрессии TNF и его рецепторов.

### *1.5.3. TNF и болезнь Альцгеймера.*

Болезнь Альцгеймера (БА) это возрастное заболевание, которое характеризуется накоплением в мозге амилоидных бляшек, нейрофибриллярных сгустков и гибелью нейронов. У пациентов подверженных данному заболеванию наблюдаются нарушения обучения и кратковременной памяти, эмоциональная нестабильность (Park & Bowers, 2011).

При анализе посмертных срезов мозга больных БА была показана совместная локализация повышенного уровня TNF и амилоидных бляшек (Dickson, 1997), а уровень TNF в СМЖ и сыворотке крови был повышен у пациентов с БА, и его уровень коррелировал с тяжестью заболевания (Paganelli et al., 2002). С другой стороны, уровень sTNF в плазме крови был снижен у пациентов с умеренными когнитивными нарушениями (Ray et al., 2007).

Ценную информацию о роли TNF в развитии патологии БА предоставили животные модели данного заболевания. Одной из генетических моделей данного заболевания являются мыши 3xTg-AD (мыши с тремя мутациями: APP<sup>SWE</sup>, PS1<sup>M146V</sup>, и Tau<sup>P301L</sup>), которые

имеют отложения амилоида и нейрофибриллярные сгустки (Sterniczuk et al., 2010). У таких мышей уровень транскрипции TNF повышен, и увеличено количество активированной микроглии (Janelsins et al., 2005). Если у таких мышей отключить еще в добавок ген TNFR1, или ввести ингибитор sTNF, то у них наблюдается уменьшение активации микроглии и уменьшение накопления амилоидных бляшек в мозге (McAlpine et al., 2010). Но длительное наблюдение за мышами 3xTg-AD с двойным нокаутом рецепторов TNF показало, что полное удаление сигналинга TNF ухудшает в целом картину заболевания за счет уменьшения фагоцитарной активности микроглии, которая занимается удалением  $\beta$ -амилоида (Montgomery & Bowers, 2012).

Положительный эффект TNF был так же показан на клеточных культурах, где присутствие TNF уменьшало нейрональную гибель, вызванную  $A\beta$ , вероятно через активацию NF $\kappa$ B сигналинга (Barger et al., 1995). Кроме того, TNF защищает нейроны от оксидативного стресса через стимуляцию антиоксидантного сигналинга и накопление супероксида через активацию MnSOD (марганец зависимая супероксид дисмутаза) (Bruce-Keller et al., 1999).

## **1.6. TNF и серотониновая система мозга.**

### *1.6.1. Общая характеристика серотониновой системы мозга.*

Серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) это нейромедиатор, который регулирует многие фундаментальные физиологические процессы и поведение включая настроение, агрессию, сон, аппетит, болевую чувствительность, регенерацию тканей, коагуляцию тромбоцитов и желудочно-кишечную функции (Baganz & Blakely, 2013; Hensler, 2012). Тела серотонинергических нейронов формируют скопления в виде девяти ядер (B1 – B9), располагающиеся вдоль средней линии ствола мозга, в ядрах шва среднего мозга. Ядра B5 и B9 образуют медиальную группу ядер, B6 и B7 – дорсальную (Hensler, 2012). Аксоны нейронов этих ядер формируют два основных восходящих пути серотонинергической системы – дорсальный перивентрикулярный и вентральный тегментальный пути (Hensler, 2012). Оба пути конвергируют в каудальной части гипоталамуса, где они присоединяются к медиальному пучку переднего мозга. Аксоны, отходящие от медиальной группы ядер (M-тип), более грубые, с большими сферическими варикозами, в отличие от аксонов дорсальных ядер (D-тип), более тонких с небольшими плеоморфными варикозами. Проекция медиальной группы ядер находится в дорсальном гиппокампе, прозрачной перегородке и гипоталамусе, дорсальной группы – в вентральном гиппокампе, миндалине и стриатуме. Кроме того, обе группы ядер имеют проекции в неокортексе. Аксоны нейронов ядер B1-B4 формируют нисходящие пути серотонинергической системы. Выделяют три

основных пути: 1) от В3 до пластины I и II заднего рога, 2) от В2 и В4 до пластины IX переднего рога, 3) от В3 до *nucleus intermediolateralis* (Hensler, 2012).

Синтезируется серотонин из незаменимой аминокислоты L-триптофана в две стадии: первая, ключевая стадия, гидроксирование, вторая – декарбоксилирование (Рисунок 5). На первой стадии L-триптофан окисляется до 5-гидрокситриптофана. Эта реакция осуществляется ферментом триптофангидроксилазой (ТПГ) (Côté et al., 2003). Существуют два фермента: ТПГ1, экспрессируемой на периферии, и ТПГ2, которая экспрессируется исключительно в мозге (Walther & Bader, 2003). Эта стадия является лимитирующей: ингибирование ТПГ2 п-хлорфенилаланином (Kulikov et al., 2012) или нокаут гена, кодирующего фермент (Gutknecht et al., 2008), приводит к резкому снижению уровня серотонина в мозге. В норме ТПГ2 не насыщена триптофаном и поэтому увеличение поступления триптофана с пищей приводит к увеличению синтеза серотонина (Hensler, 2012). Вторая стадия – декарбоксилирование 5-гидрокситриптофана до серотонина катализируется ферментом декарбоксилазой L-ароматических кислот. Данный фермент не является специфичным для синтеза серотонина и участвует также в синтезе катехоламинов (Côté et al., 2003).

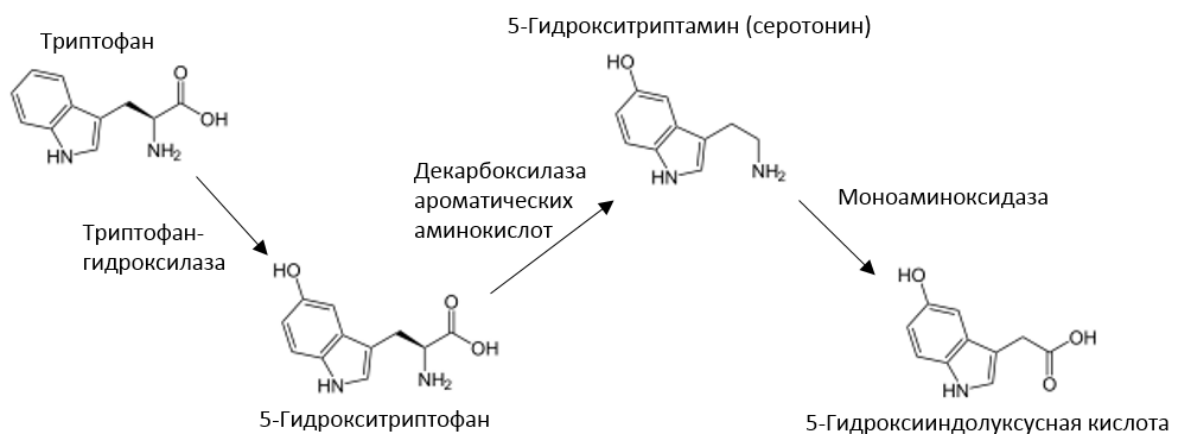


Рисунок 5. Схема синтеза и метаболизма серотонина.

Синтезированный серотонин депонируется в везикулы и аксональным транспортом доставляется в места секреции. Его накопление в везикулах в местах секреции обеспечивает быструю секрецию серотонина в ответ на деполяризацию окончания и поступление кальция в клетку (Hensler, 2012). Из внеклеточного пространства серотонин захватывается обратно в серотонинергический нейрон белком переносчиком – транспортером серотонина (SERT) (Montanez et al., 2003). Этот белок является специфическим маркером серотониновых нейронов (Montanez et al., 2003). Кроме того, серотонин может захватываться другими транспортерами (транспортер органических катионов, транспортер моноаминов плазматической мембраны, транспортер норадреналина, дофаминовый транспортер) в



другие нейроны и глиальные клетки, но с более низкой аффинностью (Hensler, 2012). В клетке захваченный серотонин редепонируется в везикулы или разрушается до 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) под действием фермента моноаминоксидазы типа А, прикрепленного к внешней мембране митохондрий (Рисунок 5) (Hensler, 2012).

Разнообразие функций, опосредованных серотонином, объясняется большим количеством видов его рецепторов и их широкое распространение в мозге млекопитающих. На данный момент описано 14 рецепторов серотонина, которые разделены на 7 типов в зависимости от структуры, механизма трансдукции сигнала и чувствительности к известным агонистам и антагонистам (Hensler, 2012). Большинство рецепторов серотонина относятся к метаболитным рецепторам, сопряженным с G-белком. В зависимости от типа G-белка, присоединение лиганда к рецептору может приводить либо к ингибированию аденилатциклазы ( $G_i$ ; 5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>1B</sub>, 5HT<sub>5</sub>), либо к активации фосфолипазы C ( $G_q$ ; 5-НТ<sub>2A</sub>, 5-НТ<sub>2B</sub>), либо к активации аденилатциклазы ( $G_s$ ; 5-НТ<sub>4</sub>, 5-НТ<sub>6</sub>, 5НТ<sub>7</sub>). Только один рецептор (5-НТ<sub>3</sub>) относится к ионотрофным каналам и регулирует поток ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>, в ответ на связывание с лигандом (Hensler, 2012).

#### *1.6.2. Серотониновая система и TNF.*

Существует много данных подтверждающих, что серотониновая система может влиять на иммунную систему и наоборот. Очень красноречиво говорит об этом тот факт, что клетки иммунной системы (такие как макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, эозинофилы, В- и Т-клетки) экспрессируют на своей поверхности рецепторы (5HT<sub>1A</sub>, 5-НТ<sub>2A</sub>, 5-НТ<sub>3</sub>, 5-НТ<sub>4</sub>, 5-НТ<sub>7</sub>, и др.) и транспортер серотонина (Baganz & Blakely, 2013). Через эти структурные единицы серотонин, в основном периферический, может напрямую модулировать процессы иммунной системы. Серотониновая система мозга влияет на иммунную систему обычно опосредовано, через гипоталамо-гипофизарный комплекс (Альперина и др., 1985; Devoino et al., 1988; Idova et al., 2012). Кроме того, 5-НТ может влиять на экспрессию цитокинов. Было показано, что серотонин увеличивает уровень мРНК TNF и IL6 в культуре клеток астроцитов человека (Pousset et al., 1996).

Известно, что активация иммунной системы, например, введение ЛПС приводит к изменению в поведении животных, и что эти изменения опосредуются цитокинами (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF) (Dantzer & Kelley, 2007; Hines et al., 2013). Было показано, что интраперитонеальное введение ЛПС увеличивало уровень серотонина и 5-ГИУК в гиппокампе крыс (Lavicky & Dunn, 1995) и мышей (Bazhenova et al., 2013). Внутримозговое введение крысам IL1 вызывало похожий эффект, который нивелировался при предварительном введении антагониста рецептора IL-1 (Linthorst et al., 1995). А

интраперитонеальное введение мышам TNF приводило к ангедонии и увеличению количества 5-ГИУК в прилежащем ядре (Heesch van et al., 2013), а так же увеличивало уровень триптофана в мозге (Ando & Dunn, 1999). С другой стороны было показано, что TNF активирует транскрипцию гена фермента индоламин-2,3-деоксигеназы (IDO) (Babcock & Carlin, 2000), который катализирует превращение триптофана в формилкинуруенин, что уменьшает количество доступного триптофана для синтеза серотонина. Так, вызванное IL-6 усиление активности IDO уменьшает отношение серотонин/триптофан (Kim et al., 2012).

Фактор некроза опухоли оказывает влияние на уровень 5-НТ через регуляцию серотонинового транспортера. Инкубирование клеток хориокарциномы человека с TNF, но не с IL-6, вызывало увеличение опосредованного SERT захвата серотонина (Mössner, 1998). TNF и IL-1 $\beta$  активируют SERT и усиливают захват серотонина в синапсоммах среднего мозга и стриатума мышей (Zhu et al., 2006). Так же на культуре клеток было показано, что TNF увеличивает экспрессию SERT и усиливает обусловленный серотониновым транспортером захват 5-НТ, и что данный эффект TNF частично осуществляется через p38 MAPK путь (Malynn et al., 2013). Результаты, полученные на культуре клеток, хорошо согласуются с данными, полученными на человеке. У людей количество TNF в плазме крови положительно коррелирует с уровнем SERT в стволе мозга как у здоровых людей, так и у больных псориазом. Прием энтарацепта, препарата, блокирующего TNF, уменьшал количество TNF в плазме и доступность SERT в стволе мозга у больных псориазом (Krishnadas et al., 2016).

Таким образом, фактор некроза опухоли может влиять на уровень серотонина в мозге через регуляцию транспортера серотонина. Так же, через регуляцию экспрессии других цитокинов, в частности IL-1 $\beta$  и IL-6 (Turner et al., 2007), TNF может влиять на уровень 5-НТ посредством активации IDO (Рисунок 6).

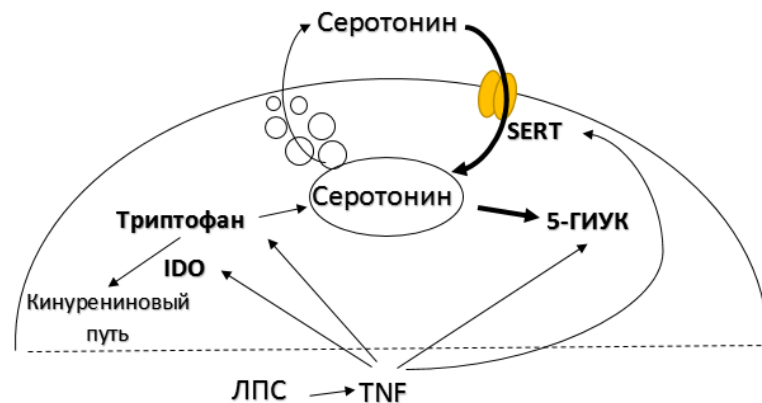


Рисунок 6. Схематичное представление связи серотонина и TNF. SERT – серотониновый транспортер, 5-ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота, IDO – индоламин-2,3-деоксигеназы, ЛПС – липополисахарид. Жирным выделены места воздействия TNF.

## 1.7. Изучение роли TNF в регуляции нервной системы и поведения с помощью нокаутных животных.

### 1.7.1. Получение мышей с нокаутом гена *Tnf*.

Первые работы по получению нокаутных животных были проведены в 80-х годах прошлого века (Hall et al., 2009). С тех пор, генетический нокаут получил широкое распространение и даже был создан международный консорциум, цель которого создать коллекцию мышей с нокаутом каждого гена (International Knockout Mouse Consortium, начал свою деятельность в 2007 году).

В настоящий момент существует несколько линий с нокаутом гена *Tnf*, различающиеся по способу получения (см. Таблицу 1). Значимым отличием в получении данных линий является способ инактивации гена. В трех линиях из пяти участок гена *Tnf* был заменен на ген устойчивости к неомицину (*neo<sup>r</sup>*, маркер положительный селекции используемый на одной из стадий получения нокаутов). Недостатком данного способа является то, что *neo<sup>r</sup>* обладает собственным сильным промотором, который может конкурировать за транскрипционные факторы с близлежащими к месту встройки генами, изменяя уровень их экспрессии (Mortensen, 2006). Рядом с геном *Tnf* располагаются гены, кодирующие LT $\alpha$  и LT $\beta$ , которые по некоторым своим функциям пересекаются с функциями TNF (Locksley et al., 2001). Изменение экспрессии этих генов может отразиться на конечном фенотипе нокаутных мышей. Альтернативой данному способу является использование метода специфической *Cre/loxP* рекомбинации, при котором не только удалится участок целевого гена, но и происходит удаление *neo<sup>r</sup>*, что приводит к получению более «чистого» нокаута (Mortensen, 2006). Мышей с дефицитом TNF активно используют для изучения роли данного цитокина при инфекционных заболеваниях (Rodriguez et al., 2009; Tun et al., 2014), различных патологиях, связанных с нарушением функции иммунной системы, например, при псориазе (Johansen et al., 2015; Raaby et al., 2015) и при воспалительном заболевании кишечника (Jones-Hall et al., 2015), кроме того таких мышей используют для изучения роли TNF в патогенезе заболеваний ЦНС (Bhaskar et al., 2014; Kassiotis & Kollias, 2001) (Таблица 2). В то же время, количество работ, изучающих мышей с дефицитом TNF в физиологически нормальном состоянии сравнительно невелико. Между тем, данные исследования могут дать представление об участии TNF в регуляции различных процессов развития и функционирования организма, а также о его роли в центральной нервной системе в отсутствии повреждающих факторов.

Таблица 1. Характеристики существующих линии мышей с нокаутом гена *Tnf*. НД – нет данных.

Статья	Pasparakis et al., 1996	Marino et al., 1997	Körner et al., 1997a (Körner et al., 1997a)	Taniguchi et al., 1997 <sup>1</sup>	Kuprash et al., 2005
Обозначение	KO(P)	KO(M)	KO(K)	KO(T)	KO
Методика	Замещение участка гена	Замещение участка гена	Замещение участка гена	НД	<i>Cre/loxP</i> рекомбин.
Вектор	$\lambda$ FIX II	PGEM-5Z	pBluescript KS	НД	pBluescript KS
Культура стволовых клеток (линия мышей)	C57BL/6 (129/Sv)	НД	BL/6-III (C57BL/6)	TT2 (C57BL/6 x CBA)	Sv129 (129/Sv)
Линия реципиент	C57BL/6	НД	BALB/c	НД	C57BL/6
Конечный бэкграунд	C57BL/6	НД	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Удаленный участок гена TNF	5'UTR, ATG кодон (инициирующей трансляции), 1 экзон, часть 1 интрона	Промотор, сайт начала транскрипции, 1 и 2 экзоны	2 и 3 экзоны, 60пн 4экзона	НД	3 и 4 экзон, нижележащий регион.
Наличие <i>neo<sup>r</sup></i>	+	+	+	НД	—

<sup>1</sup> Данную статью не удалось найти в свободном доступе, поэтому информация, представленная в таблице, взята из статьи Yamada et al., 2000 (Yamada et al., 2000)

Таблица 2. Количество публикаций, выполненных с использованием различных линий мышей с нокаутом гена *Tnf*

Кол-во цитирований	PubMed	GoogleScholar	WoS	Scopus
Pasparakis, 1996	221	942	776	-
Marino, 1997	151	713	567	596
Korner, 1997	69	253	226	234
Taniguchi, 1997	15	99	89	89
Kuprash, 2005	14	58	47	52

### 1.7.2. Изучение поведения у мышей с нокаутом гена *Tnf*.

Судя по данным цитирования (Таблица 2), наиболее широко используемой линией мышей с нокаутом TNF является линия КО(Р) (см. Таблицу 1) (Pasparakis et al., 1996), вероятно потому, что данная линия входит в коллекцию лабораторных животных поставляемых The Jackson Laboratory. Этих мышей используют в самых разнообразных работах от изучения роли TNF в регуляции восприятия вкуса (Feng et al., 2015) и слуха (Oishi et al., 2013), до изучения его роли в прионовых болезнях (O'Connor et al., 2012) и активации микроглии (Harms et al., 2012), но лишь в одной работе проводили изучение поведения интактных мышей (Golan et al., 2004). В данной работе авторы показали, что в тесте «открытое поле» отношение времени, проведенного на периферии арены, к времени, проведенному в центре, выше у нокаутных животных, кроме того у них увеличено количество дефекаций по сравнению с животными дикого типа, что свидетельствует об увеличении тревожности у КО(Р). Однако мыши КО(Р) не отличались по уровню тревожности от мышей дикого типа в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», что может свидетельствовать о неустойчивости проявления такого признака как «тревожность» у нокаутов (Golan et al., 2004). Кроме того, эти мыши не отличались от мышей дикого типа по уровню исследовательской активности в тесте «hole-board» (исследование лунок в арене). Так же не было обнаружено различий по способности к обучению в тесте «водный лабиринт Морриса», но мыши с нокаутом гена *Tnf* достоверно лучше помнили местонахождение платформы во время контрольной пробы с убранной платформой (Golan et al., 2004).

Системное изучение влияние нокаута гена *Tnf* на поведение мышей провела группа австралийских ученых на мышах КО(К) (см. Таблицу 1) (Körner et al., 1997a). В своих работах они изучали влияние нокаута TNF на двигательную активность, тревожность, исследовательское поведение, депрессивно-подобное поведение, социальное поведение,

пространственное обучение и память у мышей в возрасте трех (Baune et al., 2008; Camara et al., 2013) и шести месяцев (Camara et al., 2015). Кроме того в одной работе они изучали возрастное изменение способности к обучению у нокаутных мышей (McAfoose et al., 2009). Несмотря на то, что исследователи проводили тестирование мышей в «открытом поле», в своих работах они использовали только показания пройденного пути в качестве меры двигательной активности, не приводя информацию о времени, проведенном в центре, и о количестве дефекаций. Двигательная активность нокаутных мышей не отличалась ни в возрасте 3, ни в возрасте 6 месяцев от мышей дикого типа. Тревожность авторы оценивали в тесте «приподнятый О-образный лабиринт», существенным отличием которого является отсутствие центральной «промежуточной» площадки, как в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». В возрасте 3 месяцев уровень тревожности у КО(К) был ниже, чем у мышей дикого типа, но к возрасту 6 месяцев это различие пропадает (Camara et al., 2015; Camara et al., 2013). В противоположность тревожности, мыши в возрасте 3 месяцев не различались по показателям социального поведения, исследовательской активности (тест «hole-board»), депрессивно-подобного поведения (тест «принудительное плавание»), но в возрасте 6 месяцев мыши с нокаутом *Tnf* продемонстрировали изменение данных форм поведения по сравнению с мышами дикого типа (Camara et al., 2015; Camara et al., 2013). КО(К) в возрасте 6, но не в возрасте 3 месяцев в тесте на социальное взаимодействие одинаковое количество времени проводили рядом с пустой клеткой и клеткой с мышью, что говорит о снижении у них социального поведения. В тесте «hole-board» количество исследованных лунок у шестимесячных нокаутов было меньше по сравнению с мышами дикого типа, что говорит о более низкой исследовательской активности. И, наконец, в тесте «принудительное плавание» шестимесячные КО(К) замирают достоверно меньше, по сравнению с мышами дикого типа, что авторы интерпретируют как уменьшение депрессивно-подобного поведения у нокаутных мышей (Camara et al., 2015). Прямое сравнение мышей с нокаутом гена *Tnf* в возрасте 3, 6 и 12 месяцев на способность к пространственному обучению и памяти в тесте Барнса показало, что с возрастом выполнение задания в данном тесте у КО(К) улучшается. Так, в возрасте 3 месяцев показатели обучения и памяти ниже у нокаутных мышей по сравнению с мышами дикого типа, к возрасту 6 месяцев данные различия исчезают, а в возрасте 12 месяцев способность мышей КО(К) обучаться и правильно находить «выход» лучше по сравнению с мышами дикого типа (McAfoose et al., 2009).

Изучение поведения интактных мышей с нокаутом гена *Tnf* было проведено так же на мышах КО(Т) (см. Таблицу 1), полученных Танигучи (Taniguchi) с соавторами в 1997. Для данной линии мышей было показано увеличение количества и длительности умываний

в тесте «открытое поле» и уменьшение времени, проведенного в открытых рукавах, в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» по сравнению с мышами дикого типа, что свидетельствует об увеличении тревожности у КО(Т) (Yamada et al., 2000). Время неподвижности в тесте «принудительное плавание» меньше у нокаутных мышей по сравнению с мышами дикого типа. Классически, уменьшение времени неподвижности в данном тесте трактуется как снижение депрессивно-подобной реакции у животных (Porsolt et al., 1977). Однако в этой статье авторы трактуют уменьшение времени неподвижности как неспособность мышей выработать адекватную реакцию на стресс (Yamada et al., 2000).

Таблица 3 Сравнительная таблица результатов поведенческих тестов на разных линиях мышей с нокаутом гена *Tnf*. ↓/↑/= параметр меньше/больше/не отличается, по сравнению с мышами дикого типа.

	Camara et al., 2013	Camara et al., 2015	McAfoose et al., 2008	Golan et al., 2004	Yamada et al., 2000
Нокаутная линия	КО(К)	КО(К)	КО(К)	КО(Р)	КО(Т)
Возраст	3 месяца	6 месяцев	3, 6, 12 месяцев	1 – 3 месяца	Не указан
Тревожность	↓	=	Не исследовали	=	↑
Исследовательское поведение	=	=	Не исследовали	=	Не исследовали
Время неподвижности в ПП	=	↓	Не исследовали	Не исследовали	↓
Обучение и память	Обучен. = Память ∨	Обучен. = Память =	3 мес ↓ 6 мес = 12 мес ↑	Обучен. = Память ↑	Не исследовали

Анализ литературных данных затрудняется неполнотой информации, представленной в статьях. Австралийскими учеными было показано, что с возрастом поведение нокаутных мышей изменяется. Между тем, в работах на мышах КО(Р) и КО(Т) возраст животных либо указан нечетко, либо не указан вовсе. Немаловажно отметить влияние процедур тестирования на полученный результат. Показано, что в «приподнятом О-образном лабиринте» время, проведенное крысами в открытых рукавах больше, чем проведенное в открытых рукавах «приподнятого крестообразного лабиринта» в аналогичных условиях (Braun et al., 2011). Можно предположить, что различия по оценке

тревожности у различных линий нокаутных мышей могут быть связаны именно с этим фактом. Сравнение процедур тестирования в разных работах указаны в Приложении 1.

### 1.7.3. Биохимические и морфологические изменения мозга у мышей с нокаутом гена *Tnf*.

Поведенческие изменения у мышей с нокаутом гена *Tnf* сопровождаются изменениями в биохимии мозга. В основном исследователи изучали влияние отсутствия TNF на уровень нейротрофинов, таких как нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) и NGF. Интерес именно к этим веществам вероятней всего связан с тем, что они, как и TNF участвуют в процессах развития мозга, опосредуя как апоптотические так и антиапоптотические процессы. Изучение уровней BDNF и NGF в головном мозге независимо проводили на мышах КО(Р) и КО(К). Было показано, что BDNF и NGF обладают различной динамикой. Так, уровень NGF в гиппокампе у нокаутных мышей был достоверно выше в течение первого месяца жизни (Golan et al., 2004), ниже в возрасте 3 месяцев (Camara et al., 2013), а в шестимесячном возрасте не отличался от такового у мышей дикого типа (Camara et al., 2015; Golan et al., 2004). В то же время уровень BDNF в гиппокампе у нокаутных мышей и мышей дикого типа не отличался в течение первого месяца жизни и в возрасте 3 месяцев (Camara et al., 2013; Golan et al., 2004), но в возрасте 6 месяцев был ниже у нокаутов (Camara et al., 2015; Golan et al., 2004). Таким образом нокаут гена *Tnf* оказал влияние на возрастную динамику экспрессии BDNF и NGF.

BDNF и NGF участвуют в различных аспектах нейрогенеза, и изменение их экспрессии у мышей с нокаутом гена *Tnf* позволяет предположить, что у них же будет изменено развитие мозга. Клетки зубчатой извилины гиппокампа продолжают активно делиться, дифференцироваться и мигрировать в течение первого месяца постнатального развития (Gould et al., 1998). К моменту рождения, у мышей дикого типа в данной области плотность клеток высока, но в процессе развития и миграции, плотность клеток уменьшается, и зубчатая извилина приближается к своему зрелому состоянию. Однако у мышей КО(Р) плотность клеток в данной области гиппокампа была значительно меньше в течение первой недели постнатального развития, чем у мышей дикого типа, что говорит о более раннем формировании гиппокампа (Golan et al., 2004). Однако степень ветвления дендритов пирамидных клеток в области CA1 и CA3 у мышей с дефицитом TNF была достоверно ниже, по сравнению с мышами дикого типа, что может свидетельствовать о более низкой их функциональной активности (Golan et al., 2004).

Но участием в апоптотических процессах роль TNF в организме не ограничивается. Как было сказано ранее, TNF участвует в регуляции различных процессов нервной деятельности: синаптической передаче, поведении больного, регуляции сна, что говорит о



влиянии TNF на нейромедиаторные системы мозга. На мышях КО(Т) было показано влияние нокаута на серотониновую систему. У этих мышей уровни серотонина и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) были достоверно выше в гиппокампе, мосте и мозжечке по сравнению с мышами дикого типа. Уровень 5-ГИУК был повышен у этих мышей так же в таламусе/гипоталамусе (Yamada et al., 2000). Эти результаты свидетельствуют об увеличении метаболизма серотонина у мышей КО(Т). Стоит отметить, что не было обнаружено изменений уровней норадреналина, а также дофамина и его метаболитов ни в одной из измеренных авторами структур, что может свидетельствовать о специфическом влиянии TNF на серотониновую систему мозга (Yamada et al., 2000).

#### 1.7.4. Новая линия с нокаутом гена *Tnf*.

Поскольку фактор некроза опухоли является в первую очередь важным регуляторным элементом иммунной системы, то мышью с нокаутом гена *Tnf* чаще используют для изучения роли данного цитокина в различных иммунных процессах. Одна группа исследователей обратила внимание на то, что разные линии мышей с нокаутом гена *Tnf* различаются по степени редукции пейеровых бляшек (ПБ), скоплению лимфоидной ткани в тонком кишечнике. Основываясь на данных о том, что в нормальном развитии ПБ важную роль играет передача сигнала лимфотоксинами (LT) (Alimzhanov et al., 1997; Banks et al., 1995; Koni et al., 1997), и учитывая, что гены, кодирующие LT- $\alpha$  и LT- $\beta$ , находятся в одном локусе с геном *Tnf* (Locksley et al., 2001), авторы предположили, что модификация *Tnf* могла внести изменения в экспрессию LT по причине близкого расположения данных генов, и в результате отразиться на формировании ПБ (Kuprash et al., 2005). Для проверки этой гипотезы, методом Cre/*loxP* рекомбинации, этой группой исследователей была создана новая линия мышей с нокаутом гена *Tnf* (КО), которую они сравнивали с мышами КО(Р) и КО(М) (см. Таблицу 1). В отличие от ранее полученных линий, у КО в конечном генотипе отсутствовал ген устойчивости к неомицину, способный влиять на экспрессию близлежащих генов (см главу 1.7.1, Таблицу 1). В результате, у этой новой линии нокаутных мышей не было обнаружено признаков изменений действия LT, таких как отсутствие лимфатических узлов, нарушение строения селезенки и прочее (Kuprash et al., 2005). Любопытно, что, в отличие от КО(Р) и КО(М), у КО ПБ полностью отсутствуют, причем ни у новорождённых мышат, ни у шестнадцатидневных эмбрионов не было обнаружено даже зачатков ПБ, что может говорить о том, что TNF необходим на ранних этапах развития данных структур (Kuprash et al., 2005). Кроме того, у мышей КО(Р) и КО(М) количество лимфоцитов и нейтрофилов было выше, по сравнению с мышами новой нокаутной линии, хотя по другим параметрам гематопозеза (количество красных и белых

кровеных телец в циркулирующей крови, распределение клеток лимфоидного, миелоидного и эритроидного ряда в костном мозге) линии не различались (Kuprash et al., 2005). Таким образом, новая нокаутная линия, полученная методом Cre/*loxP* рекомбинации, отличается от нокаутных линий, полученных ранее, методом замещения участка гена на *neo<sup>r</sup>*, вероятно из-за различий в регуляции экспрессии LT.

Было показано, что экспрессия лимфотоксинов увеличена в местах нейродегенераций при рассеянном склерозе (Cannella et al., 1997; Selmaj et al., 1991) и во фронтальной коре на посмертных срезах больного большим депрессивным расстройством (Shelton et al., 2011). Кроме того, экспрессия LT была обнаружена после обработки нейротропным парамиксовирусом в клеточной культуре астроцитов (Lieberman et al., 1989) и после обработки ЛПС в культуре клеток микроглии (Appel et al., 1995), но стоит отметить, что в обоих случаях сигнал был слаб. Точно так же лишь слабый сигнал LTβ был обнаружен в мозге на срезах мышинных эмбрионов (Browning & French, 2002). Данные результаты говорят о том, что LT, как и TNF, участвуют в регуляции воспалительных процессов в мозге, однако временное и пространственное разрешение их экспрессии значительно уже, чем у TNF. У нокаутных мышей, полученных методом замещения, изменение регуляции экспрессии лимфотоксинов могло замаскировать влияние эффекта дефицита TNF не только на параметры иммунной системы, но и на параметры центральной нервной системы. Нервная система линии КО, у которой не было обнаружено изменений в экспрессии LT, ранее не была исследована.

Поэтому **целью данной работы** являлось: изучение влияния недостатка TNF на поведение, морфологию и серотониновую систему головного мозга, возрастных изменений этих характеристик у созданной российскими учеными линии мышей с нокаутом гена *Tnf*. Были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Сравнить двигательную активность, потребление пищи и воды, продолжительность сна, а также тревожность, депрессивно-подобное поведение, предрасположенность к каталепсии и способность к пространственному обучению и памяти у мышей с нокаутом гена *Tnf* и дикого типа в возрасте двух и четырех месяцев.
- 2) Изучить морфологические особенности строения мозга у мышей с нокаутом гена *Tnf* в возрасте двух и четырех месяцев.
- 3) Исследовать влияние нокаута гена *Tnf* на серотониновую (5-НТ) систему мозга (уровень и метаболизм 5-НТ) в возрасте четырех месяцев.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1. Экспериментальные животные.

Исследования проводили в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010). Опыты проводились на самцах мышей с нокаутом гена *Tnf* (KO) (Kuprash et al., 2005) и мышах линии C57Bl/6 (WT) в возрасте 2 и 4 месяцев. Нокаутная линия была завезена из питомника (Пушино) и содержалась в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН в течение 5 лет. Все животные имели SPF-статус. С момента отсадки от матерей мыши содержались в группах по 6 особей в индивидуально вентилируемых клетках (Techniplast, Италия) при регулируемом световом цикле 14:10, рассвет в 2:00, закат в 15:00, температуре 22 °С и влажности воздуха 60 %. Животным был предоставлен свободный доступ к корму и воде. За два дня до эксперимента животных рассаживали в отдельные клетки того же размера для снятия группового эффекта. Все процедуры тестирования начинались в 15:30, т.е. в темной фазе, когда животные наиболее активны. Содержание животных и тестирование проводили в соответствии с Инструкцией по содержанию и использованию лабораторных животных (NIH Publication N 80–23, США) и были одобрены комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН.

### 2.2. Тестирование поведения в домашней клетке.

Для изучения поведения животных в домашней клетке использовали программно-аппаратный комплекс PhenoMaster (TSE Systems). Установка состояла из индивидуальных клеток с инфракрасными датчиками, фиксирующими перемещение животного. Поилка и кормушка также были подсоединены к датчикам для учета потребляемой пищи и воды. Информация с датчиков раз в минуту отправлялась на компьютер, где фиксировалась программным обеспечением от производителя. Мышей рассаживали в клетки и в течение двух суток проводили наблюдение. Первые сутки считались адаптационными и не учитывались при последующем обсчете. В результате были получены данные по пройденному пути (м) за каждый час, количеству потребленной пищи (г) и воды (мл) за сутки. Была проведена оценка состояния сон/бодрствование на основе данных об активности мышей, где неподвижность животного в течение 40 секунд и более принималась за эпизод сна (Pack et al., 2007). Были построены кривые сна на основе почасовых показателей длительности сна (мин) и количества эпизодов сна.

### 2.3. Поведенческие тесты.

Для тестирования поведения использовали программно-аппаратный комплекс EthoStudio, разработанный в ФГБНУ «Институт автоматики и электрометрии СО РАН». Данный комплекс включал в себя стенд для установки арен, освещение и цифровой 3-D сенсор Kinect (Microsoft), присоединенный к компьютеру через USB-интерфейс. Этот сенсор позволяет одновременно получать обычные 2-D и 3-D изображения животного. В тестах «открытое поле» и «принудительное плавание» источник света помещался под ареной (обращенное освещение), что улучшало контраст животного с фоном (Kulikov et al., 2010; Kulikov et al., 2008). Освещенность арены составляла 300 люкс. В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» арена освещалась сверху рассеянным светом, что позволяло автоматически трассировать животное черной масти в открытых рукавах и центре лабиринта. Данные с сенсора передавались на компьютер, где обрабатывались программой EthoStudio, которая вычисляла путь, пройденный животным, и время, проведенное в той или иной части арены (в % от общего времени тестирования). Некоторые параметры фиксировались наблюдателем вручную с помощью нажатий на клавиши (Kulikov et al., 2008).

#### 2.3.1. Тест «открытое поле»

Установка для тестирования представляла собой круглую арену диаметром 55 см со стенками высотой 30 см. Животное помещали у стенки арены и давали свободно исследовать пространство в течение 5 мин. Автоматически оценивали общий пройденный путь (м), время (%) нахождения животного в центральной части арены (27.5 см в диаметре), исследованную площадь центра (%) и периферии (%). Вручную считали количество и среднюю продолжительность (с) вертикальных стоек и умываний, число дефекаций (Kulikov et al., 2008). После каждого животного арену очищали влажной и сухой салфетками.

#### 2.3.2. Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»

Установка для данного теста представляла собой четыре соединенных под прямым углом рукава длиной 30 см и шириной 6 см, находящихся на высоте 60 см над уровнем земли. Одна пара рукавов имела стенки высотой 20 см (закрытые рукава, безопасные), а другая пара была без стенок (открытые рукава, потенциально опасные). Животное сажали в место пересечения двух рукавов и автоматически фиксировали перемещение в течение 5 мин. Использование 3-D сенсора Kinect позволяло трассировать животное как в открытых, так и в закрытых рукавах. Автоматически оценивали пройденный путь (м), время (%) и исследованную площадь (%) открытых и закрытых рукавов, и время (%) в центре.

### 2.3.3. Тест «принудительное плавание»

Цилиндр высотой 30 см и диаметром 15 см наполовину заполняли водой ( $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Мышь помещали в воду на 6 мин, из которых первые 2 минуты были адаптационными. С помощью клавиш фиксировали суммарное время неподвижности животного за последние 4 мин (Kulikov et al., 2010).

### 2.3.5. Тест «щипковая каталепсия»

В наших экспериментах каталепсию у мышей вызывали щипком загривка в течение 5 с, после чего мышь помещали на две перекладины, расположенные параллельно под углом  $45^{\circ}$  на расстоянии 5 см одна от другой, и на высоте 25 см от поверхности стола, так что передние лапки животного находились на 3 см выше задних, и осторожно отпускали. Регистрировали время замирания – время в течение которого мышь не совершала попыток покинуть перекладины, сменить позу или не делала заметных движений головой или туловищем. Тест считали положительным, если мышь сохраняла неподвижность 20 с и более. Время теста ограничивали 120 с, после чего животное возвращали в клетку и через 1–2 мин повторяли тестирование. Животное, дающее 3 положительных теста из 10, считали каталептиком. Выраженность каталепсии оценивали по доле мышей-каталептиков и среднему времени замирания (с) из полученных трех (из 10) тестов с наибольшими значениями времени замирания (Куликов и др., 1989; Kulikov et al., 1993).

### 2.3.6. Тест «водный лабиринт Морриса»

Установка для теста представляла собой круглый бассейн диаметром 110 см со стенками высотой 25 см, заполненный водой ( $T 25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) с добавлением сухого молока для непрозрачности (Хоцкин и др., 2014). Арена была виртуально разделена на 4 сектора (Рисунок 7), в один из которых, на 0.5 см ниже поверхности воды, помещали платформу диаметром 5 см из прозрачного материала (стекла). В качестве визуального ориентира на внутреннюю стенку сектора, в котором располагалась платформа, приклеивали темный прямоугольник  $15 \times 10$  см. Расположение платформы не меняли в течение фазы обучения, а сектор, в котором она находилась называли «целевым». Бассейн был ярко подсвечен с помощью четырех галогеновых ламп (25 Вт каждая), которые располагались под ареной на расстоянии 40 см. Свет проходил через полупрозрачный белый матовый пластик (инвертированная подсветка). Это значительно повышало контраст животного (Kulikov et al., 2010).

Обучение мышей проходило в течение четырех дней, каждый день включал три тестирования. В начале каждого тестирования мышь помещали в бассейн в середине одного из секторов, но не целевого, и позволяли свободно искать платформу в течение 60 с. После нахождения платформы, мышь оставляли сидеть на ней до окончания тестирования, но не

менее 15 секунд. Если мышь не находила платформу по истечению времени, то мышь помещали на платформу принудительно и удерживали, при необходимости, в течение 15 с (в этом случае латентное время нахождения платформы считали равным 60 с). Фиксировали латентное время (с) нахождения платформы, пройденный путь (м) и суммарное расстояние до платформы (м). Суммарное расстояние до платформы вычислялось как сумма расстояний от мыши до платформы в каждый момент времени.

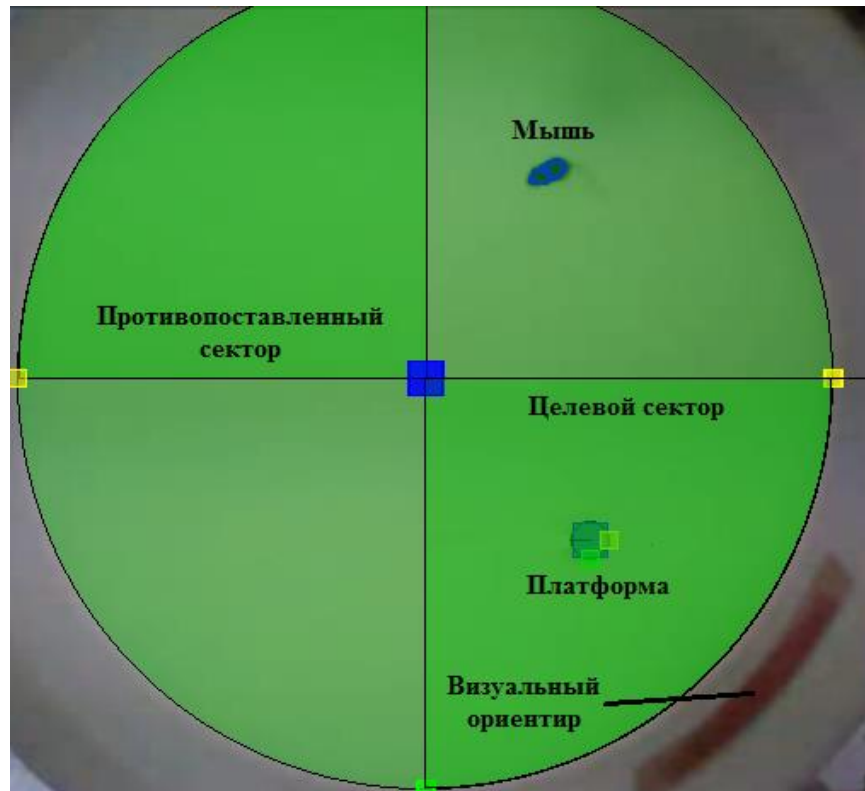


Рисунок 7. Водный лабиринт Морриса. Вид арены, фиксируемый программой с подписями. Целевой сектор – сектор в котором находилась арена.

На пятый день проводили контрольное тестирование, чтобы проверить качество формирования пространственной памяти у мышей. Для этого платформу убирали, а животное помещали в центр бассейна и фиксировали его перемещение в течение 60 с. Оценивали время нахождения (%) в целевом и противопоставленном секторах (Хоцкин и др., 2014; Kulikov et al., 2014).

#### 2.4. Магнитно-резонансная томография.

Для исследования морфологических различий в размерах мозга у животных *in vivo* мы использовали горизонтальный томограф с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, BioSpec 117/16 USR, Германия).

Для получения T2-взвешенных изображений головного мозга мыши в аксиальной, в коронарной и сагиттальных проекциях был использован метод TurboRARE-T2 (rapid

acquisition with relaxation enhancement) с параметрами импульсной последовательности TR = 2900 мсек, TE = 11 мсек и TE<sub>eff</sub> = 33 мсек. Чтобы охватить весь мозг, было сделано 21 срезов толщиной 0,5 мм и межсрезовой толщиной 0 мм, полем обзора 2 см × 2 см и размером матрицы 256 × 256 точек, продолжительность сканирования 3 мин 6 сек.

Площадь мозга в каждой проекции оценивалась как количество пикселей, умноженное на размер одного пикселя (мм<sup>2</sup>). Размер структур (%) представлен в процентах от общей площади мозга на одном соответствующем срезе.

Срез мозга аксиальной проекции, по которому проводился обсчет, располагался на уровне -2.3 от брегмы. Срез мозга коронарной проекции, по которому проводился обсчет, был четвертым от дорзальной поверхности мозга. Срез мозга сагиттальной проекции, по которому проводился обсчет, располагался на уровне брегмы.

Исследуемые структуры мозга были определены и выделены с помощью программного обеспечения “Интересующий Регион” (ROI) и стандартного атласа мозга мыши (Hof, 2000) (Рисунок 8).

Высокое разрешение магнитно-резонансного изображения четко показывает не только большие структуры мозга, но также позволяет визуализировать маленькие структуры. Разделение мозга на структуры проводилось вручную экспериментатором, который был не знаком с протоколом исследования.

Нами были исследованы следующие структуры: гиппокамп (сумма правой и левой частей, аксиальный и коронарный срез), стриатум (сумма правой и левой частей, коронарный срез), средний мозг (сумма правой и левой частей, коронарный срез), промежуточный мозг (включающий в себя таламус и гипоталамус, аксиальный срез), мозолистое тело (сагиттальный срез), гипофиз (сагиттальный и аксиальный срез), таламус (сагиттальный срез), мозжечок (сагиттальный срез), кора (коронарный срез), желудочек (аксиальный срез).

## **2.5. Нейрохимические исследования.**

Интактных мышей усыпляли углекислым газом, декапитировали и вынимали мозг. На холоде выделяли средний мозг, кору, гиппокамп и стриатум, которые помещали в стерильные пробирки Эппендорф объемом 1.5 мл, замораживали в жидком азоте и хранили при -70 °С.

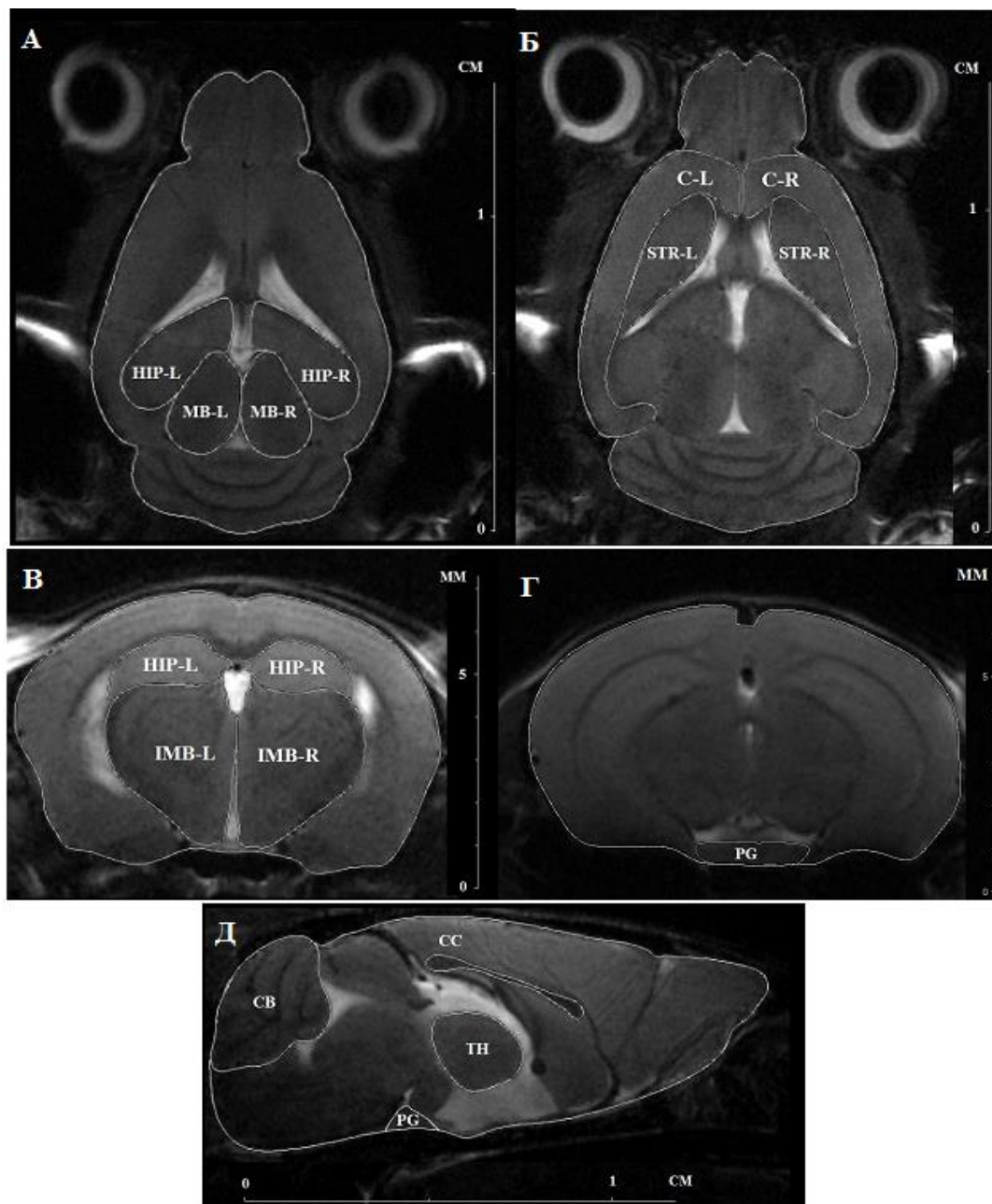


Рисунок 8. Изображения мозга мыши *in vivo*, полученные с помощью горизонтального томографа с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, BioSpec 117/16 USR, Германия). А, Б – коронарная проекция; В, Г – аксиальная проекция; Д – сагиттальная проекция. HIP L/R – передний гиппокамп левая и правая части; MB L/R – средний мозг левая и правая части; C L/R – кора левая и правая части; STR L/R – стриатум левая и правая части; IMB L/R – промежуточный мозг левая и правая части; PG – гипофиз; СВ – мозжечок; СС – мозолистое тело; ТН – таламус.

#### 2.5.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография.

На льду пробу переносили в стеклянный гомогенатор, приливали 0.6 М  $\text{HClO}_4$  в объеме 200 мкл для коры, 300 мкл для гиппокампа и стриатума, 500 мкл для среднего мозга и гомогенизировали до однородного состояния. В чистую пробирку на 1.5 мл переносили 180 мкл гомогената и центрифугировали 15 минут при 4°C и 14000 об.мин. для осаждения белка. Отбирали супернатант и разбавляли *miliQ* водой в 2 раза. Оставшийся осадок хранили при -20°C для последующего определения белка методом Бредфорда.



Система для определения уровня моноаминов и их метаболитов состояла из колонки Luna C18(2) (размер частиц 5мкм, L × I.D. 75 × 4.6 mm, Phenomenex, USA) с электрохимическим детектором (750 mV, DECADE II™ Electrochemical Detector; Antec, The Netherlands) и стеклоуглеродной ячейкой (VT-03 ячейка 3mm GC sb; Antec, The Netherlands), контролера CBM-20A, насоса LC-20AD, проточного дегазатора DGU-20A<sub>5R</sub> и устройства автоматической подачи проб SIL-20A (Shimadzu Corporation, Japan). Литр мобильной фазы содержал 13.06 г KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 мкл 0.5 М Na<sub>2</sub>EDTA, 300 мг 1-октансульфоната натрия (Sigma, USA) и метанол (13% объема; Вектор, Россия), pH = 3.2.

#### *2.5.2. Определение концентрации белка методом Бредфорда.*

К осадку белка приливали 1мл 0.1М NaOH, растворяли его при 37°C и небольшом встряхивании (1000rpm). Реактив Бредфорда (Bio-Rad Laboratories, Inc.) разводили в соотношении 1:4 milliQ H<sub>2</sub>O согласно инструкции производителя. Для определения концентрации белка в пробах к 195мкл готового реактива добавляли 5мкл пробы, встряхивали, центрифугировали и через 10 минут измеряли концентрацию белка на спектрофотометре BioPhotometer plus (Eppendorf AG, Germany) с заранее заданной калибровочной кривой.

## **2.6. Статистическая обработка.**

Все данные выражали в виде средних значений ± ошибка среднего. Потребление пищи и воды, результаты тестов «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «принудительное плавание», а также результаты томографического исследования обрабатывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим множественным сравнением по критерию Фишера. Предрасположенность к щипковой каталепсии анализировали с помощью  $\chi^2$ . Суточную динамику двигательной активности, сна, а также результаты обучения в водном лабиринте Морриса обрабатывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с повторными измерениями с последующим множественным сравнением по критерию Фишера. Время нахождения в целевом секторе водного лабиринта Морриса сравнивали со случайным распределением (25%) с помощью t-критерия Стьюдента с последующей коррекцией Бонферрони, а изучение влияния линии и возраста на этот показатель - с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Анализ результатов высокоэффективной жидкостной хроматографии был проведен однофакторным дисперсионным анализом.

## Глава 3. Результаты

### 3.1. Суточное потребление пищи и воды у животных КО и WT.

Мыши обоих генотипов не различались по суточному количеству потребленной пищи и воды (Таблица 4, Рисунок 9).

Таблица 4. Значения F-критерия для результатов двухфакторного ANOVA суточного потребления воды и пищи у мышей КО и WT возраста 2 и 4 месяца.

Признак	Фактор	F	df	p
Потребление воды, мл	Линия	F<1	1,26	
	Возраст	F<1	1,26	
	Линия x Возраст	F<1	1,26	
Потребление пищи, г	Линия	1.59	1,27	>.05
	Возраст	F<1	1,27	
	Линия x Возраст	F<1	1,27	

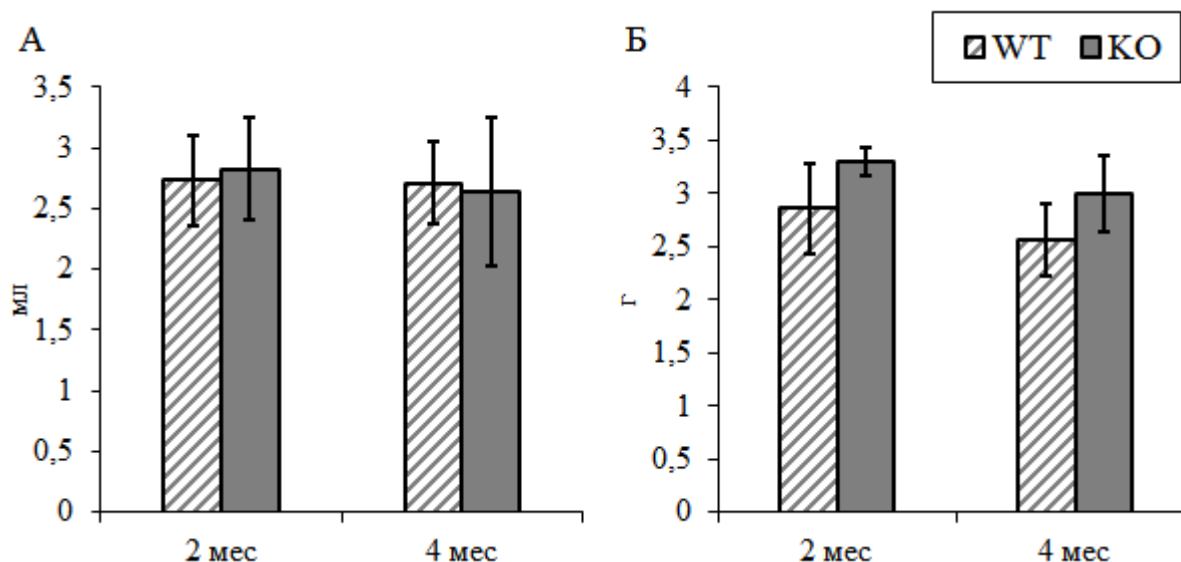


Рисунок 9. Суточное потребление воды (мл) (А) и пищи (г) (Б) в домашней клетке мышами WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев (WT 2 месяца N=8, WT 4 месяца N=8, КО 2 месяца N=8, КО 4 месяца N=8).

### 3.2. Влияние нокаута гена *Tnf* на суточную динамику двигательной активности и сна в домашней клетке у мышей КО и WT.

#### 3.2.1. Двигательная активность.

Не было обнаружено достоверного влияния факторов линия, возраст и их взаимодействия на путь, пройденный в домашней клетке (Таблица 5). Однако было показано достоверное влияние фактора время суток ( $F(23,621)=16.93$ ,  $p<.001$ ) и взаимодействие время суток x линия ( $F(23,621)=1.74$ ,  $p<.05$ ). Влияние взаимодействия

фактора время суток с фактором возраст ( $F(23,621)=1.13$ ,  $p>.05$ ) и факторами возраст и линия ( $F(23,621)=1.02$ ,  $p>.05$ ) были не достоверны. Результаты апостериорной проверки представлены на рисунке 10. Мыши обеих линий были более активны в темное время. Двигательная активность у мышей КО была выше, чем у животных WT при смене темной фазы на светлую (Рисунок10).

Таблица 5. Значения F критерия и средние значения эффектов факторов «линия» и «возраст», а также взаимодействия «линия x возраст» для результатов анализа динамики пути, пройденного в домашней клетке.

Фактор	Пройденный путь, м за час		
Линия	$F(1,27)=2.70$ , $p>0.05$		
	WT	$70.83 \pm 3.77$	
	КО	$79.75 \pm 3.91$	
Возраст	$F(1,27)<1$		
	2 мес	$75.29 \pm 3.77$	
	4 мес	$75.29 \pm 3.91$	
Линия x Возраст	$F(1,27)<1$		
	WT	2 мес	$68.57 \pm 5.34$
		4 мес	$73.09 \pm 5.34$
	КО	2 мес	$82.01 \pm 5.34$
		4 мес	$77.49 \pm 5.71$

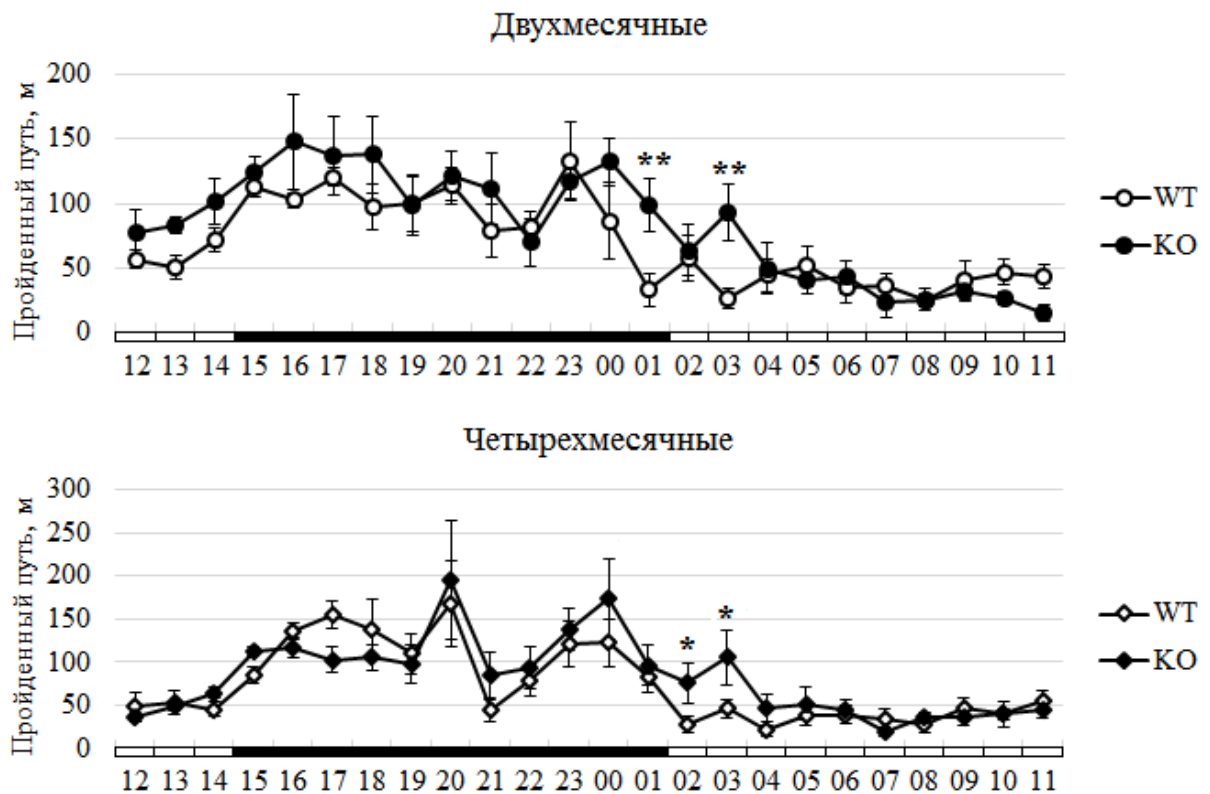


Рисунок 10. Суточная динамика двигательной активности в домашней клетке у мышей WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев (WT 2 месяца N=8, WT 4 месяца N=8, КО 2 месяца N=8, КО 4 месяца N=8). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  vs WT.

## 3.2.2. Сон.

Достоверное влияние фактора линия было показано для длительности сна и для количества эпизодов сна: средняя продолжительность сна была меньше, а среднее число эпизодов сна – больше у мышей КО по сравнению с животными WT. В то же время, факторы возраст и линия x возраст не оказывали достоверного влияния (Таблица 6).

Было показано достоверное влияние фактора время суток и взаимодействие время суток x линия на длительность сна ( $F(23,644)=27.31$ ,  $p<.001$ ;  $F(23,644)=1.91$ ,  $p<.01$ ) и количество эпизодов сна ( $F(23,644)=18.33$ ,  $p<.001$ ;  $F(23,644)=1.68$ ,  $p<.05$ ), а так же взаимодействие время суток x возраст на количество эпизодов сна ( $F(23,644)=1.68$ ,  $p<.05$ ). Результаты апостериорной проверки показаны на рисунке 11. Мыши обеих линий больше спали в светлое время. Двухмесячные мыши КО меньше спали в дневное время по сравнению с животными WT. В ночное время межлинейных различий в продолжительности сна выявлено не было. Мыши КО и WT практически не различались по длительности сна и числу эпизодов сна (Рисунок 11).

Таблица 6. Значения F критерия и средние значения эффектов факторов «линия» и «возраст», а также взаимодействия «линия x возраст» для результатов двухфакторного ANOVA динамики сна (WT 2 месяца N=8, WT 4 месяца N=8, КО 2 месяца N=8, КО 4 месяца N=8).

Фактор		Длительность сна, мин	Количество эпизодов
Линия		$F(1,28)=8.87$ , $p<.01$	$F(1,28)=5.96$ , $p<.05$
	WT	$25.02 \pm 0.63$	$10.27 \pm 0.26$
	КО	$22.38 \pm 0.63$	$11.18 \pm 0.26$
Возраст		$F(1,28)=1.42$ , $p>.05$	$F(1,28)=2.67$ , $p>.05$
	2 мес	$23.17 \pm 0.63$	$11.03 \pm 0.26$
	4 мес	$24.23 \pm 0.63$	$10.42 \pm 0.26$
Линия x Возраст		$F(1,28)<1$	$F(1,28)<1$
	WT 2 мес	$24.06 \pm 0.88$	$10.66 \pm 0.37$
	WT 4 мес	$25.98 \pm 0.88$	$9.88 \pm 0.37$
	КО 2 мес	$22.29 \pm 0.88$	$11.40 \pm 0.37$
	КО 4 мес	$22.48 \pm 0.88$	$10.96 \pm 0.37$

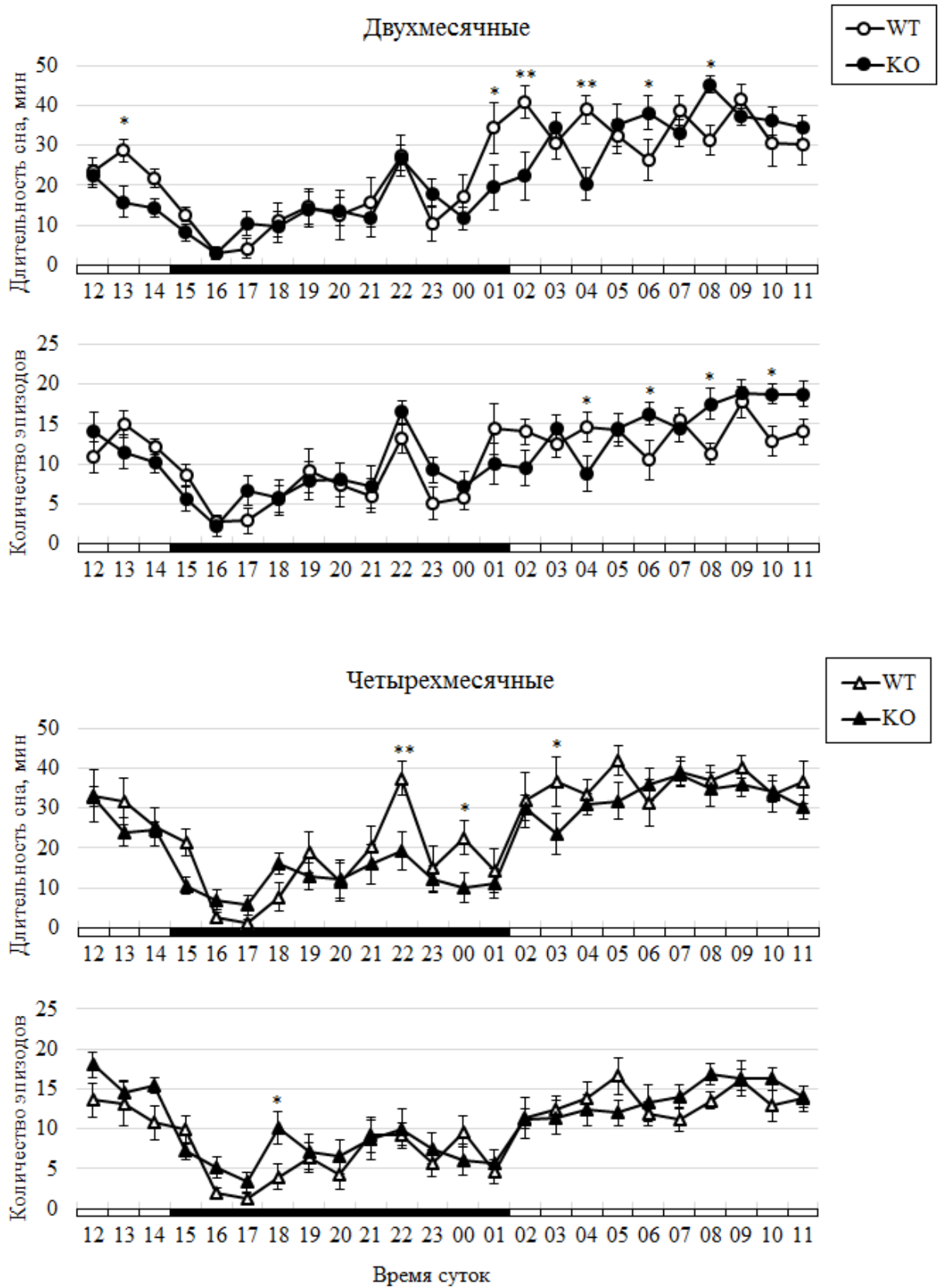


Рисунок 11. Суточная динамика длительности и числа эпизодов сна у мышей WT и KO в возрасте 2 и 4 месяца (WT 2 месяца N=8, WT 4 месяца N=8, KO 2 месяца N=8, KO 4 месяца N=8). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs WT.

### **3.3. Поведение мышей КО и WT возраста 2 и 4 месяцев в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «принудительное плавание», «щипковая катаlepsия» и «водный лабиринт Морриса».**

#### *3.3.1. Тест «открытое поле».*

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа представлены в таблице 7, средние значения  $\pm$  ошибка средней вместе с результатами апостериорной проверки представлены в таблице 8.

Достоверное влияние хотя бы одного фактора было показано для всех измеренных показателей, кроме исследованной площади периметра и количества умываний. Было показано, что как у мышей WT, так и у мышей КО пройденный путь меньше ( $p < .001$ ,  $p < .01$ ), а время в центре больше ( $p < .01$ ,  $p < .001$ ) в возрасте четырех месяцев по сравнению с возрастом два месяца. Кроме того у мышей КО по сравнению с мышами WT время в центре было достоверно выше как в возрасте 2 ( $p < .05$ ), так и в возрасте 4 месяцев ( $p < .05$ ). Исследованная площадь центра больше у мышей КО в возрасте 2 месяцев ( $p < .001$ ), но к возрасту 4 месяца данный показатель увеличивается у WT ( $p < .001$ ) и различия между линиями исчезают. Количество вертикальных стоек меньше в возрасте 4 месяцев и у WT ( $p < .01$ ), и у КО ( $p < .001$ ), но средняя длительность стойки меньше только у КО ( $p < .01$ ) по сравнению с двухмесячным возрастом. Мыши обеих линий обоих возрастов не различались по количеству умываний, но средняя длительность умывания у КО в возрасте 4 месяцев выше, чем в возрасте 2 месяцев ( $p < .05$ ). Количество дефекаций было достоверно выше у мышей КО по сравнению с мышами WT в возрасте 4 месяцев ( $p < .001$ ).

Было высказано предположение, что уменьшение двигательной активности с возрастом в данном тесте могло оказать влияние на другие исследованные параметры. Для проверки этой гипотезы сначала провели корреляционный анализ между пройденным путем и остальными параметрами. Достоверная корреляция была обнаружена между двигательной активностью (пройденный путь), временем в центре ( $r = -0.62$ ,  $p < .001$ ), количеством вертикальных стоек ( $r = 0.56$ ,  $p < .001$ ). Затем был проведен ковариационный анализ данных переменных с поправкой на пройденный путь как коварианту (Таблица 9). Несмотря на то, что было показано достоверное влияние пути на данные параметры, влияние факторов линия и возраст (для времени в центре) или только возраст (для количества вертикальных стоек) осталось достоверным, что было подтверждено результатами апостериорной проверки.

Таблица 7. Значения F-критерия для характеристик поведения в тесте «открытое поле» мышей WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев.

Признак	Фактор	F	df	p	
Пройденный путь, м	Линия	4.05	1,36	.052	
	Возраст	24.49	1,36	<.001	
	Линия x Возраст	F<1	1,36		
Исследованная площадь центра, %	Линия	15.38	1,35	<.001	
	Возраст	17.71	1,35	<.001	
	Линия x Возраст	5.36	1,35	<.05	
Исследованная площадь периметра, %	Линия	F<1	1,35		
	Возраст	2.25	1,35	>.05	
	Линия x Возраст	1.82	1,35	>.05	
Время в центре, %	Линия	25.59	1,36	<.001	
	Возраст	34.22	1,36	<.001	
	Линия x Возраст	2.99	1,36	>.05	
Дефекации	Линия	17.30	1,36	<.001	
	Возраст	F<1	1,36		
	Линия x Возраст	2.35	1,36	>.05	
Умывание	Количество	Линия	1.34	1,36	>.05
		Возраст	2.18	1,36	>.05
		Линия x Возраст	F<1	1,36	
	Средняя продолжительность	Линия	F<1	1,36	
		Возраст	4.55	1,36	<.05
		Линия x Возраст	2.26	1,36	>.05
Вертикальные стойки	Количество	Линия	F<1	1,36	
		Возраст	32.31	1,36	<.001
		Линия x Возраст	F<1	1,36	
	Средняя продолжительность	Линия	F<1	1,36	
		Возраст	4.39	1,36	<.05
		Линия x Возраст	4.64	1,36	<.05

Таблица 8. Средние значения  $\pm$  ошибка среднего для характеристик поведения в тесте «открытое поле» у мышей WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев.

Признак	WT		КО			
	2 мес	4мес	2 мес	4мес		
Пройденный путь, м	36.50 $\pm$ 1.51 N=8	25.97 $\pm$ 2.20*** N=12	31.56 $\pm$ 2.03 N=8	23.23 $\pm$ 1.39** N=12		
Изученная площадь центра, %	18.10 $\pm$ 1.68 N=8	23.18 $\pm$ 0.44*** N=12	22.95 $\pm$ 0.39^^ N=8	24.43 $\pm$ 0.24 N=11		
Изученная площадь периметра, %	69.50 $\pm$ 1.00 N=8	69.26 $\pm$ 1.59 N=12	70.62 $\pm$ 0.53 N=8	65.98 $\pm$ 2.07 N=11		
Время в центре, %	5.40 $\pm$ 0.93 N=8	14.90 $\pm$ 1.55** N=12	13.07 $\pm$ 0.64^ N=8	30.53 $\pm$ 3.31*** ^^ N=12		
Дефекации	0.38 $\pm$ 0.18 N=8	0.17 $\pm$ 0.11 N=12	1.38 $\pm$ 0.53 N=8	2.33 $\pm$ 0.48^^ N=12		
Вертикальные стойки	Умывания	Количество	1.75 $\pm$ 0.16 N=8	3.00 $\pm$ 0.63 N=12	1.63 $\pm$ 0.60 N=8	1.92 $\pm$ 0.40 N=12
		Средняя продолжительность	1.70 $\pm$ 0.44 N=8	2.03 $\pm$ 0.43 N=12	0.64 $\pm$ 0.32 N=8	2.55 $\pm$ 0.64* N=12
Вертикальные стойки	Умывания	Количество	39.00 $\pm$ 4.07 N=8	21.25 $\pm$ 3.58** N=12	44.50 $\pm$ 4.31 N=8	20.17 $\pm$ 2.85*** N=12
		Средняя продолжительность	0.65 $\pm$ 0.04 N=8	0.65 $\pm$ 0.04 N=12	0.71 $\pm$ 0.05 N=8	0.52 $\pm$ 0.04** ^ N=12

\*p<.05 \*\*p<.01 \*\*\*p<.001 по сравнению с двухмесячными мышами той же линии; ^p<.05 ^^p<.001 по сравнению с мышами WT того же возраста.

Таблица 9. Результат ковариационного анализа времени в центре и числа вертикальных стоек в тесте «открытое поле» у мышей WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев. Пройденный путь был взят как коварианта.

Признак	Фактор	F	df	p
Время в центре, %	Путь	5.38	1,35	<.05
	Линия	18.85	1,35	<.001
	Возраст	10.91	1,35	<.01
	Линия x Возраст	4.17	1,35	<.05
Количество вертикальных стоек	Путь	7.02	1,35	<.05
	Линия	2.11	1,35	>.05
	Возраст	9.31	1,35	<.01
	Линия x Возраст	1.46	1,35	>.05



### 3.3.3. Тест «приподнятый крестообразный лабиринт».

Как и в тесте «открытое поле», было показано достоверное влияние возраста на путь, пройденный в приподнятом крестообразном лабиринте (Таблица 10). Апостериорная проверка по Фишеру показала, что путь достоверно уменьшается с возрастом как у мышей линии WT ( $p < .001$ ), так и линии КО ( $p < .001$ ) (Таблица 11). Коэффициент корреляции между пройденным путем в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» составляет  $r = 0.59$  ( $p < .001$ ).

Мыши не различались по времени нахождения и исследованной площади в закрытых рукавах (Таблица 10, 11), но исследованная площадь открытого рукава была достоверно меньше у мышей WT в возрасте 4 месяцев, по сравнению с двухмесячными ( $p < .01$ ), а также у мышей КО по сравнению с WT в возрасте двух ( $p < .001$ ) и четырех месяцев ( $p < .05$ ) (Таблица 10, 11). Изменение пройденного пути с возрастом достоверно не коррелировало с исследованной площадью в открытых рукавах ( $r = .0997$ ,  $p > 0.05$ ).

Таблица 10. Значения F-критерия для характеристик поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» у мышей WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев.

Признак	Фактор	F	df	p
Пройденный путь, м	Линия	F<1	1,32	
	Возраст	59.08	1,32	<.001
	Линия x Возраст	1.89	1,32	>.05
Время в центре, %	Линия	F<1	1,32	
	Возраст	2.60	1,32	>.05
	Линия x Возраст	F<1	1,32	
Время в закрытых рукавах, %	Линия	F<1	1,32	
	Возраст	1.35	1,32	>.05
	Линия x Возраст	2.11	1,32	>.05
Время в открытых рукавах, %	Линия	1.23	1,32	>.05
	Возраст	F<1	1,32	
	Линия x Возраст	4.54	1,32	<.05
Исследованная площадь закрытых рукавов, %	Линия	1.37	1,32	>.05
	Возраст	2.89	1,32	>.05
	Линия x Возраст	F<1	1,32	
Исследованная площадь открытых рукавов, %	Линия	36.37	1,32	<.001
	Возраст	1.88	1,32	>.05
	Линия x Возраст	11.22	1,32	<.01

Таблица 11. Средние значения  $\pm$  ошибка среднего для характеристик поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» у мышей WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев.

Признак	WT		КО	
	2	4	2	4
Пройденный путь, м	7.22 $\pm$ 0.27 N=7	5.00 $\pm$ 0.14 <sup>***</sup> N=11	7.86 $\pm$ 0.61 N=6	4.66 $\pm$ 0.35 <sup>***</sup> N=12
Время в центре, %	12.52 $\pm$ 0.76 N=7	16.05 $\pm$ 1.39 N=11	11.10 $\pm$ 2.25 N=6	15.76 $\pm$ 3.16 N=12
Время в закрытых рукавах, %	71.25 $\pm$ 1.94 N=7	72.64 $\pm$ 2.51 N=11	82.50 $\pm$ 3.41 N=6	69.84 $\pm$ 6.15 N=12
Время в открытых рукавах, %	16.22 $\pm$ 1.29 N=7	11.31 $\pm$ 1.35 N=11	6.40 $\pm$ 1.50 <sup>\$</sup> N=6	14.40 $\pm$ 3.98 N=12
Исследованная площадь закрытых рукавов, %	96.54 $\pm$ 0.30 N=7	94.46 $\pm$ 0.61 N=11	95.55 $\pm$ 0.47 N=6	90.65 $\pm$ 2.84 N=12
Исследованная площадь открытых рукавов, %	59.79 $\pm$ 5.38 N=7	40.90 $\pm$ 4.14 <sup>**</sup> N=11	22.24 $\pm$ 2.88 <sup>^^</sup> N=6	30.16 $\pm$ 2.60 <sup>^</sup> N=12

<sup>\*\*\*</sup>p<.01 <sup>\*\*\*</sup>p<.001 по сравнению с двухмесячными мышами той же линии; <sup>^</sup>p<.05 <sup>^^</sup>p<.001 по сравнению с мышами WT того же возраста; <sup>\$</sup>p=.051 по сравнению с двухмесячными WT.

### 3.3.4. Тест «принудительное плавание».

Было обнаружено достоверное влияние фактора линия ( $F(1,34)=4.63$ ,  $p<.05$ ) и фактора возраст ( $F(1,34)=73.68$ ,  $p<.001$ ) на время неподвижности в тесте «принудительное плавание». Влияние взаимодействие линия  $\times$  возраст было на границе достоверности ( $F(1,34)=3.90$ ,  $p=.056$ ). Проверка по Фишеру показала, что с возрастом увеличивается время неподвижности как у мышей WT ( $p<.001$ ), так и у КО ( $p<.001$ ). Кроме того, было показано, что в возрасте 4 месяцев время неподвижности у мышей нокаутной линии достоверно меньше по сравнению с мышами дикого типа ( $p<.01$ ) (Таблица 12).

Было показано, что время неподвижности отрицательно коррелирует с пройденным мышами путем в тестах «открытое поле» ( $r = -0.69$ ,  $p<.001$ ) и «приподнятый крестообразный лабиринт» ( $r = -0.62$ ,  $p<.01$ ).

Таблица 12. Время неподвижности (с) в тесте «принудительное плавание» у мышей WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев.

Признак	WT		КО	
	2m	4m	2m	4m
Время неподвижности, с	52.55 $\pm$ 3.01 N=8	144.16 $\pm$ 7.00 <sup>***</sup> N=10	51.01 $\pm$ 5.94 N=8	108.35 $\pm$ 11.26 <sup>*** ^^</sup> N=12

<sup>\*\*\*</sup>p<.001 по сравнению с двухмесячными мышами той же линии; <sup>^^</sup>p<.01 по сравнению с мышами WT того же возраста

### 3.3.5. Тест «щипковая каталепсия».

У мышей КО в возрасте 2 месяцев (N=13) среднее время каталептического замирания равнялось  $25.51 \pm 4.89$  секунд, а количество каталептиков – 46%. Ни одно двухмесячное животное дикого типа (N=10) не проявляло реакцию замирания: среднее время неподвижности и процент каталептиков у них равнялся нулю. Различия как по времени неподвижности ( $F(1,21)=20.67$ ,  $p<.001$ ), так и по проценту каталептиков ( $\chi^2=6.24$ ,  $p<.05$ ; двусторонний Фишер  $p<.05$ ) между мышами WT и КО в двухмесячном возрасте были достоверны. В возрасте 4 месяцев не было обнаружено ни одного каталептика среди мышей WT (N=7) и КО (N=7).

### 3.3.6. Тест «водный лабиринт Морриса».

На скорость животных не было обнаружено влияния ни одного фактора, для фактора возраст было показано достоверное влияние на суммарное расстояние до платформы, а фактор день обучения достоверное влиял практически на все параметры (Таблица 13). Апостериорная проверка по Фишеру показала, что у всех групп мышей значения латентного времени и пройденного пути были достоверно меньше на четвертый день по сравнению с первым, но показатель суммарного расстояния до платформы уменьшается на четвертый день только у четырехмесячных мышей (Рисунок 12). Стоит отметить, что данный показатель выше у мышей WT в возрасте 4 месяцев по сравнению с двухмесячными животными на первый ( $p<.0.01$ ) и второй день обучения ( $p<.05$ ), а так же у мышей КО в возрасте 4 месяцев на первый ( $p<.05$ ), второй ( $p<.05$ ) и третий день обучения ( $p<.05$ ) по сравнению с двухмесячным возрастом (Рисунок 12).

На пятый день все группы мышей проводили достоверно больше времени в целевом секторе по сравнению с противопоставленным (2 мес: WT  $t = -8.88$ ,  $df=7$ ,  $p<.001$ ; КО  $t = -5.1$ ,  $df=7$ ,  $p<.01$ ; 4 мес: WT  $t = -4.9$ ,  $df=10$ ,  $p<.001$ , КО  $t = -3.14$ ,  $df=11$ ,  $p<.01$ ). Для всех четырех исследованных групп мышей значения времени в целевом секторе были достоверно выше случайных значений (25%) (Рисунок 13). Двухфакторный анализ не выявил влияния фактора линия ( $F(1,35)=2.84$ ,  $p>.05$ ), возраст ( $F(1,35)=1.02$ ,  $p>.05$ ) или взаимодействия линия x возраст ( $F(1,35)=1.14$ ,  $p>.05$ ) на время, проведенное в целевом секторе.

Таблица 13. Значения F-критерия для двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями для четырех дней обучения в водном лабиринте Морриса у мышей WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев.

Признак	Фактор	F	df	p
Суммарное расстояние до платформы, м	Линия	1.02	1,35	>.05
	Возраст	11.97	1,35	<.01
	Линия x возраст	F<1	1,35	
	День обучения	12.25	3,105	<.001
	День x линия	F<1	3,105	
	День x возраст	2.43	3,105	>.05
	День x линия x возраст	F<1	3,105	
Латентное время нахождения платформы, с	Линия	1.54	1,35	>.05
	Возраст	F<1	1,35	
	Линия x возраст	F<1	1,35	
	День обучения	34.29	3,105	<.001
	День x линия	F<1	3,105	
	День x возраст	2.31	3,105	>.05
	День x линия x возраст	1.98	3,105	>.05
Пройденный путь, м	Линия	F<1	1,35	
	Возраст	F<1	1,35	
	Линия x возраст	F<1	1,35	
	День обучения	45.07	3,105	<.001
	День x линия	F<1	3,105	
	День x возраст	1.63	3,105	>.05
	День x линия x возраст	2.68	3,105	.051
Скорость, м/с	Линия	2.41	1,35	>.05
	Возраст	F<1	1,35	
	Линия x возраст	F<1	1,35	
	День обучения	1.30	3,105	>.05
	День x линия	F<1	3,105	
	День x возраст	1.18	3,105	>.05
	День x линия x возраст	F<1	3,105	

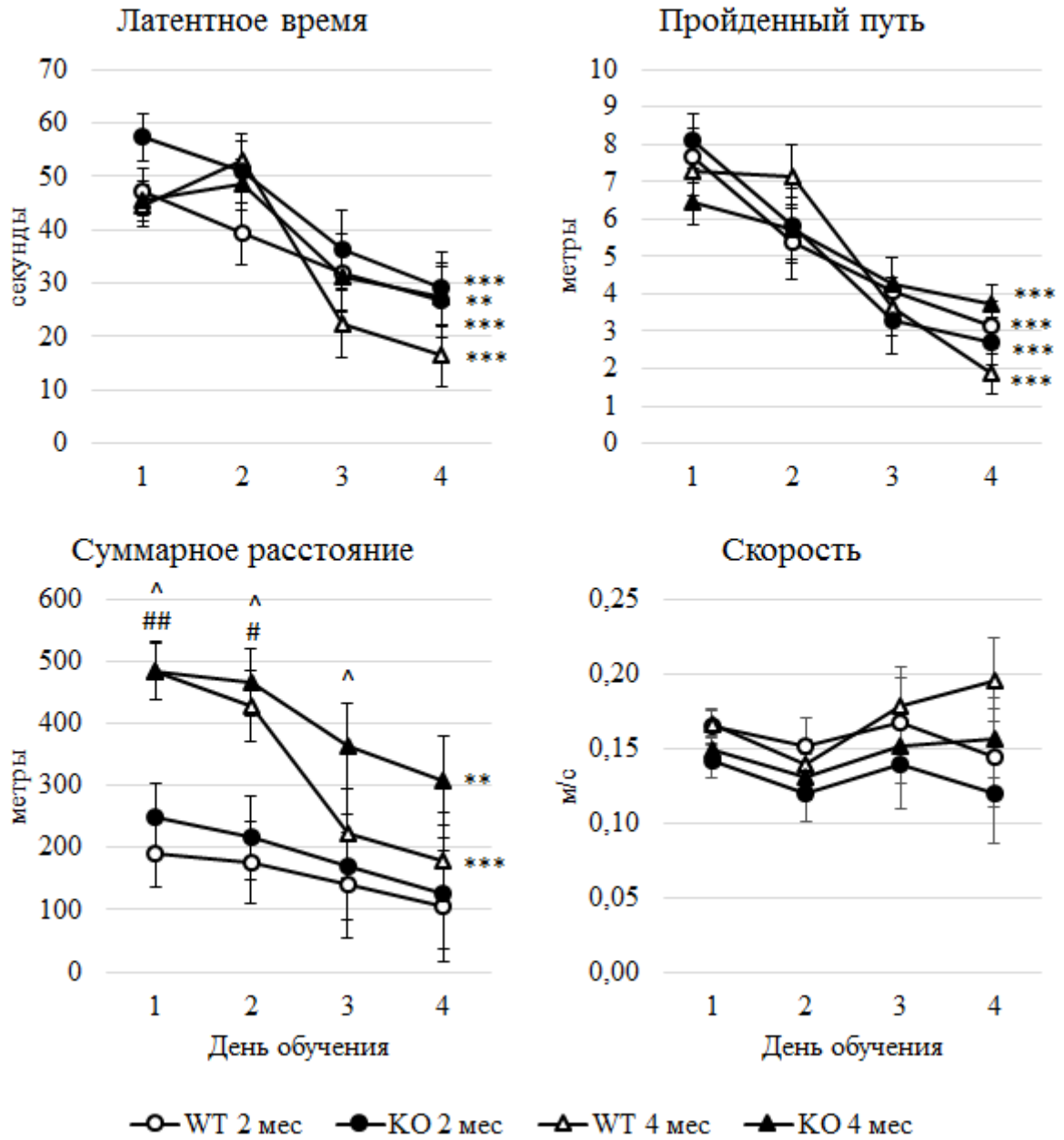


Рисунок 12. Динамика изменения латентного времени (с), пройденного пути (м) и суммарного расстояния до платформы (м), а также скорости движения (м/с) при обучении мышей WT и KO в возрасте 2 и 4 месяцев в тесте «водный лабиринт Морриса» (WT 2 месяца N=8, WT 4 месяца N=12, KO 2 месяца N=8, KO 4 месяца N=12). \*\*  $p < .01$ , \*\*\*  $p < .001$  по сравнению с первым днём; ^  $p < .05$  по сравнению с показателем того же дня двухмесячных KO; #  $p < .05$ , ##  $p < .01$  по сравнению с показателем того же дня двухмесячных WT.

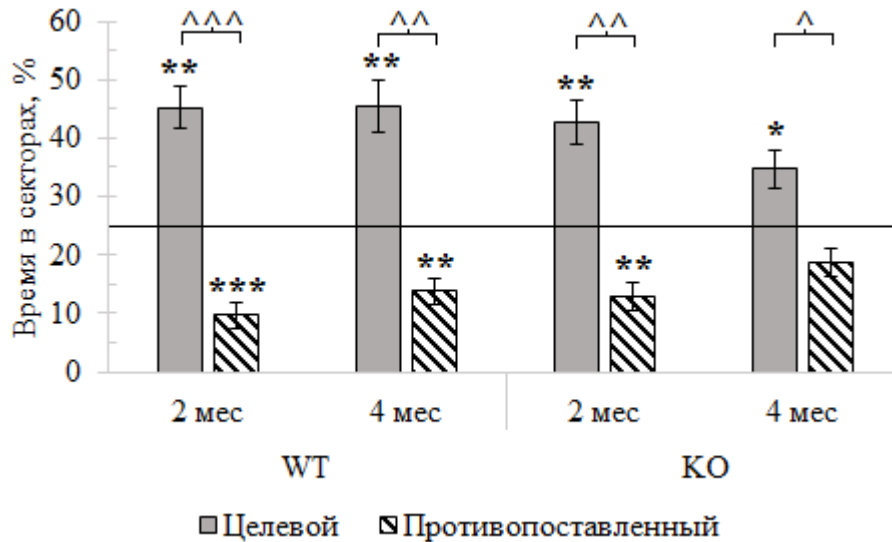


Рисунок 13. Время (%) в целевом и противоположенном секторах на 5 день после обучения в водном лабиринте Морриса у мышей WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев (WT 2 месяца N=8, WT 4 месяца N=12, КО 2 месяца N=8, КО 4 месяца N=12). \* $p < .05$  \*\* $p < .01$  vs 25% (черная горизонтальная линия), ^ $p < .05$ , ^^ $p < .01$ , ^^ $p < .001$  по сравнению с противоположенным сектором.

#### 3.4. Влияние нокаута гена *Tnf* на морфологию головного мозга. Данные магнитно-резонансной томографии.

Не было обнаружено влияния фактора линия, возраст или взаимодействия линия x возраст на размер площади срезов, на которых были измерены структуры (Таблица 14, 15), следовательно, площадь среза не влияла на обнаруженные различия в размерах структур мозга.

Было обнаружено влияние возраста на размеры различных структур, влияние линии было показано только для гипофиза в сагиттальной проекции (Таблица 16). У мышей дикого типа в возрасте 4 месяцев размер мозжечка достоверно меньше по сравнению с двухмесячными животными ( $p < .05$ ), а у мышей с нокаутом гена *Tnf* в возрасте 4 месяцев по сравнению с мышами двухмесячного возраста достоверно меньше размер таламуса ( $p < .05$ ) (Таблица 17). На аксиальной проекции как у WT, так и у КО размер гипофиза достоверно уменьшался с возрастом ( $p < .01$ ,  $p < .05$ ), но в сагиттальной проекции в двухмесячном возрасте размер гипофиза у мышей нокаутной линии был достоверно меньше по сравнению с мышами дикого типа ( $p < .01$ ) (Таблица 17).

Таблица 14. МРТ анализ. Значения F-критерия для анализа площади срезов мозга, используемых для выделения структур, у мышей WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев.

Проекция	bregma	Фактор	F	df	p
<i>sagittal</i>	0	Линия	F<1	1,24	
		Возраст	3.31	1,24	>.05
		Линия x Возраст	F<1	1,24	
<i>axial</i>	-0,28	Линия	F<1	1,24	
		Возраст	F<1	1,24	
		Линия x Возраст	1.85	1,24	>.05
	-3,38	Линия	F<1	1,23	
		Возраст	F<1	1,23	
		Линия x Возраст	F<1	1,23	
	-2,055	Линия	F<1	1,24	
		Возраст	F<1	1,24	
		Линия x Возраст	F<1	1,24	
<i>coronal</i>	2,5	Линия	F<1	1,22	
		Возраст	F<1	1,22	
		Линия x Возраст	2.14	1,22	>.05
	2	Линия	1.96	1,22	>.05
		Возраст	F<1	1,22	
		Линия x Возраст	1.57	1,22	>.05

Таблица 15. МРТ анализ. Средние  $\pm$  ошибки площадей (мм<sup>2</sup>) срезов мозга, используемых для выделения структур, у мышей WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев.

Проекция	bregma	WT	WT	КО	КО
		2m	4m	2m	4m
<i>sagittal</i>	0	71.69 $\pm$ 0.38	72.28 $\pm$ 0.50	71.81 $\pm$ 0.34	72.23 $\pm$ 0.27
		N=8	N=5	N=8	N=6
<i>axial</i>	-0.28	44.41 $\pm$ 0.86	45.19 $\pm$ 0.60	45.05 $\pm$ 0.87	43.59 $\pm$ 0.74
		N=8	N=6	N=8	N=6
	-3.38	53.64 $\pm$ 0.92	53.97 $\pm$ 0.50	53.92 $\pm$ 0.73	53.11 $\pm$ 0.69
		N=8	N=5	N=8	N=6
	-2.06	52.11 $\pm$ 0.90	53.24 $\pm$ 0.57	52.17 $\pm$ 0.50	52.29 $\pm$ 0.69
		N=8	N=6	N=8	N=6
<i>coronal</i>	2.5	104.50 $\pm$ 0.80	105.09 $\pm$ 0.63	105.71 $\pm$ 0.53	105.13 $\pm$ 0.48
		N=6	N=8	N=5	N=6
	2	100.75 $\pm$ 1.25	102.94 $\pm$ 1.86	100.56 $\pm$ 0.82	99.54 $\pm$ 1.19
		N=6	N=8	N=6	N=6

Таблица 16. МРТ анализ. Значения F-критерия для анализа размеров структур мозга у мышей WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев.

Проекция	bregma	Структура	Фактор	F	df	p
<i>sagittal</i>	0	Таламус	Линия	2.85	1,24	>.05
			Возраст	6.12	1,24	<.05
			Линия x Возраст	1.20	1,24	>.05
		Мозолистое тело	Линия	F<1	1,24	
			Возраст	1.45	1,24	>.05
			Линия x Возраст	1.35	1,24	>.05
		Гипофиз	Линия	6.41	1,23	<.05
			Возраст	F<1	1,23	
			Линия x Возраст	3.66	1,23	>.05
		Мозжечок	Линия	F<1	1,24	
			Возраст	7.19	1,24	<.05
			Линия x Возраст	F<1	1,24	
<i>axial</i>	-0,28	Желудочек	Линия	F<1	1,24	
			Возраст	F<1	1,24	
			Линия x Возраст	F<1	1,24	
	-3,38	Гиппокамп	Линия	F<1	1,23	
			Возраст	F<1	1,23	
			Линия x Возраст	F<1	1,23	
	-2,055	Промежуточный мозг	Линия	F<1	1,23	
			Возраст	3.09	1,23	>.05
			Линия x Возраст	F<1	1,23	
	-2,055	Гипофиз	Линия	F<1	1,24	
			Возраст	14.91	1,24	<.001
			Линия x Возраст	F<1	1,24	
<i>coronal</i>	2,5	Стриатум	Линия	2.49	1,22	>.05
			Возраст	F<1	1,22	
			Линия x Возраст	F<1	1,22	
		Кора	Линия	F<1	1,22	
			Возраст	4.29	1,22	.05
			Линия x Возраст	F<1	1,22	
	2	Гиппокамп	Линия	3.59	1,22	>.05
			Возраст	15.81	1,22	<.001
			Линия x Возраст	F<1	1,22	
		Средний мозг	Линия	F<1	1,22	
			Возраст	F<1	1,22	
			Линия x Возраст	F<1	1,22	



Таблица 17. МРТ анализ. Средние  $\pm$  ошибки площадей структур мозга у мышей WT и КО в возрасте 2 и 4 месяцев. Размеры структур даны в процентах от площадей соответствующих срезов.

Срез	WT		КО		
	2m	4m	2m	4m	
<i>sagittal</i> 0	Таламус	5.97 $\pm$ 0.09 N=8	5.81 $\pm$ 0.18 N=6	5.90 $\pm$ 0.08 N=8	5.48 $\pm$ 0.12 * N=6
	Мозолистое тело	2.13 $\pm$ 0.09 N=8	1.95 $\pm$ 0.05 N=6	2.01 $\pm$ 0.07 N=8	2.00 $\pm$ 0.07 N=6
	Гипофиз	0.85 $\pm$ 0.04 N=7	0.74 $\pm$ 0.06 N=6	0.67 $\pm$ 0.02 ^^ N=8	0.72 $\pm$ 0.04 N=6
	Мозжечок	12.60 $\pm$ 0.23 N=8	11.80 $\pm$ 0.36 * N=6	12.54 $\pm$ 0.10 N=8	12.06 $\pm$ 0.25 N=6
<i>axial</i> -0.28 мм	Желудочек	6.69 $\pm$ 0.54 N=8	6.77 $\pm$ 0.46 N=6	6.82 $\pm$ 0.70 N=8	6.54 $\pm$ 0.62 N=6
	Гиппокамп	9.12 $\pm$ 0.32 N=8	9.45 $\pm$ 0.19 N=5	9.20 $\pm$ 0.28 N=8	9.10 $\pm$ 0.16 N=6
	Промежуточный мозг	33.31 $\pm$ 0.52 N=8	32.49 $\pm$ 0.71 N=5	33.70 $\pm$ 0.34 N=8	32.74 $\pm$ 0.49 N=6
<i>axial</i> -3.38 мм	Гипофиз	3.19 $\pm$ 0.13 N=8	2.67 $\pm$ 0.15 ** N=6	3.06 $\pm$ 0.09 N=8	2.57 $\pm$ 0.16 * N=6
<i>axial</i> -2.055 мм	Гипофиз	3.19 $\pm$ 0.13 N=8	2.67 $\pm$ 0.15 ** N=6	3.06 $\pm$ 0.09 N=8	2.57 $\pm$ 0.16 * N=6
<i>coronal</i> 2.5 мм	Стриатум	11.74 $\pm$ 0.37 N=6	11.67 $\pm$ 0.15 N=6	11.28 $\pm$ 0.26 N=8	11.22 $\pm$ 0.30 N=6
	Кора	26.78 $\pm$ 0.54 N=6	25.81 $\pm$ 0.54 N=6	27.14 $\pm$ 0.51 N=8	26.03 $\pm$ 0.37 N=6
	Гиппокамп	13.25 $\pm$ 0.21 N=6	14.12 $\pm$ 0.35 * N=6	12.51 $\pm$ 0.25 N=8	13.82 $\pm$ 0.27 ** N=6
	Средний мозг	11.28 $\pm$ 0.36 N=6	11.13 $\pm$ 0.35 N=6	11.61 $\pm$ 0.27 N=8	11.41 $\pm$ 0.44 N=6
<i>coronal</i> 2 мм	Средний мозг	11.28 $\pm$ 0.36 N=6	11.13 $\pm$ 0.35 N=6	11.61 $\pm$ 0.27 N=8	11.41 $\pm$ 0.44 N=6

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  по сравнению с двухмесячными животными той же линии, ^^ $p < 0.01$  по сравнению с мышами дикого типа того же возраста

### 3.5. Влияние нокаута гена *Tnf* на уровень и метаболизм серотонина в мозге. Данные высокоэффективной жидкостной хроматографии.

У четырехмесячных животных с нокаутом гена *Tnf* количество серотонина в коре и гиппокампе было достоверно больше по сравнению с мышами дикого типа (Таблица 18). Метаболизм серотонина в коре был достоверно ниже у КО по сравнению с WT, а в гиппокампе у КО показатели были ниже на уровне тенденции ( $p=.05$ ). В стриатуме не было найдено различий по серотонину между двумя линиями животных, но уровень 5-ГИУК был достоверно выше у КО по сравнению с WT, а метаболизм, как и в гиппокампе, был ниже у КО на уровне тенденции ( $p=.055$ ). Не было обнаружено различий по уровню серотонина и 5-ГИУК, а также по показателю метаболизма между КО и WT в среднем мозге (Таблица 18).

Таблица 18. Уровень серотонина, 5-ГИУК и их отношение в коре, гиппокампе, стриатуме и среднем мозге у мышей WT (N=6) и КО (N=6) в возрасте 4 месяцев.

	WT	КО	F	p
<b>Серотонин, нг/мг белка</b>				
Кора	2.99 ± 0.22	4.28 ± 0.22	F(1,10)=16.06	<.01
Гиппокамп	2.83 ± 0.28	3.6 ± 0.09	F(1,10)=6.69	<.05
Стриатум	2.81 ± 0.09	3.23 ± 0.24	F(1,10)=2.63	>.05
Средний мозг	34.09 ± 4.86	38.69 ± 5.16	F(1,14)<1	
<b>5-ГИУК, нг/мг белка</b>				
Кора	2.24 ± 0.1	2.03 ± 0.13	F(1,10)=1.61	>.05
Гиппокамп	3.61 ± 0.18	3.51 ± 0.12	F(1,10)<1	
Стриатум	1.83 ± 0.08	2.18 ± 0.13	F(1,10)=5.05	<.05
Средний мозг	16.60 ± 1.98	19.11 ± 2.36	F(1,14)<1	
<b>5-ГИУК/Серотонин</b>				
Кора	0.78 ± 0.09	0.48 ± 0.33	F(1,10)=9.38	<.05
Гиппокамп	1.35 ± 0.16	0.97 ± 0.03	F(1,10)=4.9	.05
Стриатум	0.65 ± 0.02	0.68 ± 0.03	F(1,10)<1	
Средний мозг	0.48 ± 0.01	0.50 ± 0.02	F(1,13)=1.01	>.05

## Глава 4. Обсуждение результатов

Существующие линии с нокаутом гена *Tnf* используются уже в течение многих лет, однако лишь недавно группа австралийских ученых начала планомерное исследование деятельности ЦНС у интактных мышей одной из линий, КО(К). Подобные исследования на мышцах линий КО(Р) и КО(Т) проводились лишь в единичных работах, в то время как линия КО(М) совсем не исследовалась вне патологического контекста. Исследование интактных мышей было сосредоточено в основном на изучении их поведения и нейротрофической системы мозга. Кроме того было проведено изучение серотониновой системы мозга, однако не проводили повторения результатов данного исследования. В данной работе мы впервые охарактеризовали поведение, морфологию и серотониновую систему мозга, а так же возрастные изменения у мышей линии КО, созданной в 2005 году под руководством российских исследователей.

### 4.1. Влияние на сон.

Известно, что TNF участвует в регуляции сна (Bredow et al., 1997; Fang et al., 1997; Floyd & Krueger, 1997; Takahashi et al., 1995a; Takahashi et al., 1996) (глава 1.4.3), однако изучение влияние нокаута гена *Tnf* на сон ранее не проводилось. Мы впервые показали, что мыши с дефицитом фактора некроза опухоли имели меньшую длительность сна и большее количество эпизодов сна, что хорошо согласуется с литературными данными о сомногенном влиянии TNF. Однако обнаруженные изменения имели разную природу в возрасте двух и в возрасте четырех месяцев. Общая динамика сна у всех групп мышей была одинакова, но двухмесячные нокауты дольше сохраняли состояние активности на начало светлого времени суток, хотя потом выходили на тот же уровень, что и мыши дикого типа, и даже иногда превосходили их по длительности сна в определенные часы за счет увеличения количества эпизодов. В четырехмесячном возрасте КО меньше спят в темное время суток, а в светлое время суток практически не отличаются от WT. Наличие такого смещения периодов активности у мышей КО можно объяснить незавершенностью процессов формирования мозга и продолжением процессов реорганизации его структур, в том числе и таламуса, который участвует в регуляции сна (Coulon et al., 2012). Мы показали, что размер таламуса у четырехмесячных нокаутов меньше, чем у двухмесячных (Таблица 17). Результаты данной работы являются лишь обозначением того, что нокаут гена *Tnf* приводит к изменениям в регуляции сна у мышей, но требуется более детальное изучение данных процессов электрофизиологическими, биохимическими и гистологическими методами.

#### 4.2. Влияние нокаута гена *Tnf* на двигательную активность.

Мыши КО и WT обоих возрастов не различались между собой по пройденному пути в домашней клетке. Этот результат хорошо согласуется с данными других авторов, полученными на других нокаутных линиях: Не было выявлено различий по двигательной активности у мышей КО(К) в возрасте 3 и 6 месяцев (Camara et al., 2015; Camara et al., 2013) и у мышей КО(Т) (Yamada et al., 2000) по сравнению с соответствующими животными дикого типа. Нами не было выявлено межлинейных различий для мышей КО и WT по пройденному пути в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Другие авторы также не обнаружили различий в двигательной активности в данном тесте между мышами КО(К) и соответствующими животными дикого типа (Camara et al., 2015; Camara et al., 2013). Однако мы обнаружили достоверное уменьшение пройденного пути в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» с возрастом у мышей обеих линий. Это согласуется с данными о возрастном уменьшении пройденного пути в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» у мышей C57Bl/6J (Shoji et al., 2016).

#### 4.3. Влияние нокаута гена *Tnf* на тревожность и эмоциональность.

Известно, что время в центре в тесте «открытое поле» и в открытых рукавах в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» являются отрицательно коррелируют с уровнем тревожности (Milner & Crabbe, 2008; Prut & Belzung, 2003). Имеющиеся литературные данные по влиянию нокаута гена *Tnf* на тревожность мышей трудно сравнивать, поскольку они выполнены на животных разного возраста и с использованием различных методик. Так, не было обнаружено различий по времени, проведенному в открытых и закрытых рукавах между шестимесячными КО(К) (Camara et al., 2015) и КО(Р) (Golan et al., 2004) и соответствующими им особями дикого типа того же возраста. В работах же на КО(К) в возрасте 3 месяцев (Camara et al., 2013) и КО(Т) (Yamada et al., 2000) нокаутные мыши проводили больше времени в открытых рукавах, чем мыши дикого типа. Неоднозначные результаты были получены нами при изучении влияния нокаута гена *Tnf* на тревожность. С одной стороны, в тесте «открытое поле» мыши КО и в два, и в четыре месяца проводят больше времени в центре арены, что говорит о более низкой тревожности, с другой стороны в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» исследованная площадь открытых рукавов у них меньше, а в возрасте 2 месяцев меньше время, проведенное в открытых рукавах, что, наоборот, свидетельствует о более высокой тревожности у нокаутов. Следует отметить, что в данном исследовании мы впервые предложили и использовали новый критерий тревожности в тесте «приподнятый крестообразный

лабиринт» – исследованная площадь в открытых рукавах. Этот критерий имеет существенное преимущество перед классическим временем в открытых рукавах, т.к. позволяет оценить направленное исследование опасных открытых рукавов и позволяет исключить трусливых животных, которые, случайно попав в открытые рукава, замирают там. С помощью ковариационного анализа было установлено, что сниженная тревожность мышей КО в тесте «открытое поле» не связана с какими либо различиями в их двигательной активности, поскольку она сохраняется после коррекции на двигательную активность (Таблица 9). Данные различия могут быть объяснены тем, что в открытом поле стрессоры (открытое освещенное пространство) не достаточно сильны. Так освещенность поля в тесте «открытое поле» составляет 300 люкс и сходна с освещенностью в домашней клетке в светлое время. Можно предполагать, что мыши привыкли к такой освещенности и она не является для них стрессором. В то же время, в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» мыши сталкиваются с незнакомой им угрозой – высотой и испытывают к ней страх.

В тесте «открытое поле» у КО, как и у КО(Р) (Golan et al., 2004) повышен уровень дефекаций в возрасте 4 месяцев. С другой стороны у них не наблюдается усиления активности пищеварения, о чем говорит отсутствие различий по количеству потребленной пищи и воды в домашней клетке. Таким образом увеличение дефекаций может свидетельствовать об усилении эмоциональности мышей КО. Кроме того длительность умывания у КО, как и КО(Т) (Yamada et al., 2000), увеличена, что также можно интерпретировать в рамках усиления эмоциональности у мышей. Вероятно, данное изменение так же нашло отражение в уменьшении средней продолжительности вертикальной стойки у КО, поскольку мыши в состоянии повышенной эмоциональности быстрее переключаются с одного типа активности на другой.

#### *4.4. Влияние на депрессивно-подобное поведение.*

Влияние различных факторов на депрессивно-подобное состояние животных в тесте «принудительное плавание» оценивают по изменению времени неподвижности (Porsolt et al., 1977). Все известные клинически эффективные антидепрессанты уменьшают время неподвижности животных в данном тесте (Caldarone et al., 2015; Cryan & Mombereau, 2004; Petit-Demouliere et al., 2005; Willner, 1990; Willner & Mitchell, 2002). Введение TNF, в свою очередь, увеличивало время неподвижности мышей в тесте «принудительное плавание» и усиливало их депрессивно-подобное состояние (Kaster et al., 2012). Но введение антител TNF или флуоксетина, избирательного ингибитора обратного захвата серотонина, нивелировало депрессантные свойства TNF (Kaster et al., 2012; Krügel et al., 2013; Manosso

et al., 2013). Нокаут гена *Tnf* также привел к уменьшению времени неподвижности, как в нашей работе у мышей КО в четыре месяца, так и у КО(Т) (Yamada et al., 2000) и шестимесячных КО(К) (Camara et al., 2015).

Однако не было обнаружено влияния нокаута гена *Tnf* на депрессивно-подобное поведение у более молодых животных: ни КО в возрасте 2 месяцев, ни КО(К) в возрасте трех месяцев (Camara et al., 2013), не отличались от мышей дикого типа по времени неподвижности. В нашей работе такое возрастное отличие возможно связано с проявлением реакции каталептического замирания у мышей КО в возрасте 2 месяцев. Ранее была показана связь каталепсии с депрессивно-подобным поведением у мышей (Базовкина и др., 2005), поэтому, можно ожидать, что у двухмесячных КО снижение депрессивно-подобного замирания в тесте «принудительное плавание» маскируется проявлением каталептического замирания.

#### *4.5. Влияние нокаута гена *Tnf* на пространственное обучение и память.*

В нашей работе мы показали, что мыши обоих возрастов обеих линий одинаково хорошо обучались и воспроизводили выученный результат в тесте «водный лабиринт Морриса». Это не согласуется с выводами касательно пространственной памяти, полученными в работах на других нокаутах. Было показано, что у мышей КО(К) пространственная память в возрасте 3 месяцев хуже, чем у мышей дикого типа, но с возрастом становится лучше (Camara et al., 2015; Camara et al., 2013; McAfoose et al., 2009). С другой стороны, мыши КО(Р) хоть и не отличались по способности к обучению, но лучше воспроизводили выученный результат уже в возрасте 3 месяцев (Golan et al., 2004). Вероятно данные различия в результатах связаны с использованием различных методик и протоколов тестирования (Приложение 1). Если сравнивать протоколы теста «водный лабиринт Морриса» на мышах КО(Р) и КО, то существенным отличием является формат проведения контрольной пробы (Golan et al., 2004). Проведение контрольной пробы в тот же день, что и обучение, задействует больше кратковременную память, в то время как проведение теста на следующий день отражает долговременную память животных (Vorhees & Williams, 2014), соответственно у КО(Р) лучше кратковременная память, но про долговременную такого сказать нельзя. У мышей КО(К) пространственную память исследовали в тесте Барнс, который отличается от теста «водный лабиринт Морриса» более низким уровнем стресса (Harrison et al., 2009), поскольку в качестве основного стимула для поиска «выхода» использует страх животных перед открытыми ярко-освещенными пространствами, а не аверсивный страх перед водой. В нашей работе мы показали, что мыши КО в условиях открытого поля находятся в менее тревожном состоянии, чем мыши

дикого типа, что может приводить к более низкой мотивации мышей к поиску «выхода» в условиях теста Барнс. Показатели пространственной памяти у мышей КО(К) в возрасте 3 месяцев хуже, чем у мышей дикого типа, но поскольку авторы не приводят данные о времени в центре в тесте «открытое поле», то нет возможности оценить, действительно ли пространственная память у мышей хуже или это лишь отражение сниженной тревожности у мышей (Samara et al., 2013). Таким образом, нельзя однозначно сказать, лучше или хуже пространственная память у мышей КО(К) в возрасте 3 месяцев. Однако в возрасте 6 месяцев КО(К) не отличались от мышей дикого типа по времени, проведенному в центре открытого поля, и по времени нахождения «выхода» в тесте Барнс (Samara et al., 2015). Основываясь на изложенных данных, можно предположить, что у мышей с нокаутом гена *Tnf* лучше кратковременная (Golan et al., 2004), но не долговременная пространственная память.

#### 4.6. Влияние на каталепсию.

Каталепсия – это форма пластической ригидности мышц, которая в норме присутствует у животных как элемент пассивно-оборонительного поведения (Dixon, 1998), но при чрезмерном проявлении является признаком различных психонейропатологий (Caroff et al., 2000; Daniels, 2009; Paparrigopoulos et al., 2009; Weder et al., 2008). В нашей работе мы впервые показали, что около 50% мышей с нокаутом гена *Tnf* в возрасте 2 месяцев проявляют реакцию каталептического замирания, но в возрасте 4 месяцев среди КО не было обнаружено ни одного каталептика. Ранее в нашей лаборатории было показано, что у мышей с предрасположенностью к каталепсии размер гипофиза меньше (Kulikova et al., 2016; Tikhonova et al., 2013). В нашей работе в возрасте 2 месяцев, но не в возрасте четырех, размер гипофиза меньше у мышей КО по сравнению с мышами WT, что соответствует проявлению реакции каталептического замирания. Данный результат является еще одним свидетельством в пользу существования связи предрасположенности к каталепсии с размером гипофиза.

Однако в данной работе проявление каталепсии, как и размер гипофиза вероятно вызваны изменением темпов формирования отделов мозга у КО, а не наличием патологических состояний у мышей. Мы показали, что общий размер гипофиза уменьшается с возрастом у мышей КО и WT (аксиальный срез), что свидетельствует о продолжении процессов изменений в данной структуре, возможно связанное с окончанием пубертатного периода. Поскольку гипофиз является важным эндокринным органом, то его изменение у двухмесячных нокаутов может быть сопряжено с изменением секреции различных гормонов, которые могут повлиять на результаты исследования. Таким образом,

при работе с нокаутными по *Tnf* мышами стоит внимательно относиться к выбору возраста, в зависимости от целей исследования.

#### *4.6. Изменения в серотониновой системе.*

В возрасте 4 месяцев у мышей КО уровни серотонина в коре и гиппокампе повышены. Аналогично увеличение количества серотонина было показано на мышях КО(Т), но только в гиппокампе (Yamada et al., 2000), что может быть связано с различием во времени забора материала (Egashira et al., 2000; Morin, 1999; Robson et al., 1993). Известно, что в основе действия клинически эффективных антидепрессантов, таких как флуоксетин, лежит увеличение количества серотонина в синаптической щели (Haase & Brown, 2015; Hale et al., 2013; Hamon & Blier, 2013; Köhler et al., 2016; Olivier, 2015; Walker, 2013), и, как было сказано выше, антидепрессанты уменьшают время неподвижности в тесте «принудительное плавание» (Petit-Demouliere et al., 2005). В нашей работе уменьшение времени неподвижности в тесте «принудительное плавание» связано с увеличением уровня серотонина в коре и гиппокампе, что свидетельствует об антидепрессантном эффекте дефицита TNF. Данный результат является еще одним свидетельством в пользу депрессантного действия TNF и согласуется с цитокиновой теорией депрессии (Kulikov & Popova, 2015; Lapin & Oxenkrug, 1969; Maes, 2008; Maes et al., 2011; Myint & Kim, 2014; Oxenkrug, 2010).

Помимо участия в механизмах депрессии, серотонин так же участвует в регуляции цикла сон-бодрствование. Роль серотонина в этих процессах двояка. С одной стороны, имеются данные, что введение серотонина оказывает сомногенный эффект (Jouvet, 1972; Koella, 1969; Koella & Czicman, 1966; Koella et al., 1968; Ursin et al., 1989), с другой стороны, активность серотонинергических ядер выше во время фазы бодрствования и уменьшает во время фазы сна (Cesuglio et al., 1981; McGinty & Harper, 1976; Trulson & Jacobs, 1979). Было показано, что во время медленноволновой стадии сна стимуляция дорсальных ядер шва приводит к увеличению серотонина в префронтальной коре и вызывает активацию кортикальных нейронов, что может служить одним из механизмов пробуждения (Puig & Gullledge, 2011). В нашей работе повышенный уровень серотонина в коре может обеспечивать повышенную активность кортикальных нейронов, что приводит к увеличению длительности состояния бодрствования и уменьшению длительности сна у нокаутных животных.



## Заключение

Недостаток TNF не влияет на двигательную активность мышей, на потребление пищи и воды. Однако у мышей с нокаутом гена TNF длительность сна меньше, что говорит о важной роли TNF в регуляции сна. Кроме того, TNF активно участвует в регуляции психоэмоциональных процессов: его отсутствие уменьшает выраженность депрессивно-подобного поведения, вероятно увеличивает тревожность и эмоциональность. Уменьшение депрессивно-подобного поведения у нокаутных мышей сопровождается увеличением у них уровней серотонина в коре и гиппокампе, что согласуется с серотониновой гипотезой депрессии.

Одним из существенных наблюдений данной работы является вывод о возрастных изменениях, отражающихся на морфологии мозга и поведении мышей с недостатком TNF. Так, вероятно имеется связь между изменением размера таламуса и различиями в динамике сна у двух- и четырехмесячных нокаутных мышей. Кроме того, в двухмесячном возрасте у мышей с недостатком сна меньше размер гипофиза и уровень проявления каталептического замирания достигает 46%, в то время как в четырехмесячном возрасте не обнаружено различий по размеру гипофиза и не было найдено ни одного каталептика. Данный факт важен при выборе возраста нокаутных мышей при планировании эксперимента, так как предрасположенность к каталепсии у двухмесячных мышей с нокаутом гена *Tnf* может повлиять на результаты тестов.

## Выводы

1) Врожденный дефицит TNF не оказал влияния на двигательную активность в домашней клетке, тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» и способность к пространственному обучению и пространственную память в тесте «водный лабиринт Морриса» у мышей. Двигательная активность в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» уменьшалась с возрастом у мышей обеих линий.

2) Продолжительность сна была меньше, а число эпизодов сна – больше у мышей с нокаутом гена *Tnf* по сравнению с животными дикого типа.

3) У мышей с нокаутом гена *Tnf* в возрасте 4 месяцев отмечено достоверное снижение времени депрессивно-подобного замирания в тесте «принудительное плавание» по сравнению с животными дикого типа.

4) В возрасте 2 месяцев 46% мышей с нокаутом гена *Tnf* проявляли реакцию каталептического замирания, но в возрасте 4 месяцев среди нокаутных мышей не было обнаружено ни одного каталептика. Мыши дикого типа в возрасте 2 и 4 месяцев не демонстрировали каталепсию.

5) Методом магнитной резонансной томографии выявлено достоверное уменьшение размера гипофиза у мышей с нокаутом гена *Tnf* по сравнению с животными дикого типа. Однако нокаутные мыши не отличались от животных дикого типа по размеру гипофиза в возрасте 4 месяцев.

6) У мышей с нокаутом гена *Tnf* в возрасте 4 месяцев было выявлено увеличение уровня серотонина в коре и гиппокампе, уровня 5-гидроксииндолуксусной кислоты в стриатуме, а также уменьшение отношения 5-гидроксииндолуксусной кислоты к серотонину в коре и гиппокампе по сравнению с животными дикого типа.

## Список используемых сокращений

5-НТ – 5-гидрокситриптамин, серотонин

5-ГИУК – 5-гидроксииндолуксусной кислоты

6-ОНДА – 6-гидроксидофамин

BDNF – нейротрофический фактор мозга

IDO – индоламин-2,3-деоксигеназы

IFN – интерферон

IL – интерлейкин

LT $\alpha,\beta$  – лимфотоксины  $\alpha,\beta$

NF $\kappa$ B – nuclear factor of kappa B

NGF – nerve growth factor фактор роста нервов

SERT – серотониновый транспортер

TNF – tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли,

TNFR – рецепторы TNF

БА – болезнь Альцгеймера

БП – болезнь Паркинсона

ВЛМ – тест «водный лабиринт Морриса»

ЛПС – липополисахарид

МРТР – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин

РС – рассеянный склероз

СМЖ – спинномозговая жидкость

ТПГ – триптофангидроксилаза

ЦНС – центральная нервная система

ЭАЭ – экспериментальная модель аутоиммунного энцефаломиелита

## Список цитируемой литературы

1. Альперина Е.Л., Идова Г.В., Девойно Л.В. Роль гипофиза в модулирующем влиянии на иммунный ответ допаминергической и серотонинергической систем. // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 1985. Т. 70. № 11. С. 1428–1432.
2. Базовкина Д.В., Куликов А.В., Кондаурова Е.М., Попова Н.К. Селекция на предрасположенность к каталепсии усиливает депрессивноподобное поведение у мышей // Генетика. 2005. Т. 41. № 9. С. 1222–1228.
3. Куликов А.В., Козлачкова Е.Ю., Попова Н.К. Генетический контроль каталепсии у мышей // Генетика. 1989. Т. 25. С. 1402–1408.
4. Хоцкин Н.В., Фурсенко Д.В., Базовкина Д.В., Куликов В.А., Куликов А.В. Автоматическое измерение характеристик пространственного обучения у мышей в тесте водный лабиринт Морриса с обращенным освещением // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2014. Т. 100. № 1. С. 36–44.
5. Albenis B.C., Mattson M.P. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. // Synapse. 2000. V. 35. № 2. P. 151–159.
6. Alimzhanov M.B., Kuprash D. V, Kosco-Vilbois M.H., Luz A., Turetskaya R.L., Tarakhovskiy A., Rajewsky K., Nedospasov S.A., Pfeffer K. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997. V. 94. № 17. P. 9302–7.
7. Ando T., Dunn A.J. Mouse tumor necrosis factor- $\alpha$  increases brain tryptophan concentrations and norepinephrine metabolism while activating the HPA axis in mice // Neuroimmunomodulation. 1999. V. 6. № 5. P. 319–329.
8. Appel K., Honegger P., Gebicke-Haerter P.J. Expression of interleukin-3 and tumor necrosis factor-beta mRNAs in cultured microglia. // J. Neuroimmunol. 1995. V. 60. № 1–2. P. 83–91.
9. Arnett H.A., Mason J., Marino M., Suzuki K., Matsushima G.K., Ting J.P. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. // Nat. Neurosci. 2001. V. 4. № 11. P. 1116–1122.
10. Babcock T.A., Carlin J.M. Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. // Cytokine. 2000. V. 12. № 6. P. 588–594.
11. Baganz N.L., Blakely R.D. A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin // ACS Chem. Neurosci. 2013. V. 4. № 1. P. 48–63.
12. Baker D., Butler D., Scallan B.J., O'Neill J.K., Turk J.L., Feldmann M. Control of

established experimental allergic encephalomyelitis by inhibition of tumor necrosis factor (TNF) activity within the central nervous system using monoclonal antibodies and TNF receptor-immunoglobulin fusion proteins. // *Eur. J. Immunol.* 1994. V. 24. № 9. P. 2040–2048.

13. Baker E., Chen L.Z., Smith C.A., Callen D.F., Goodwin R., Sutherland G.R. Chromosomal location of the human tumor necrosis factor receptor genes. // *Cytogenet. Cell Genet.* 1991. V. 57. № 2–3. P. 117–118.

14. Banks T.A., Rouse B.T., Kerley M.K., Blair P.J., Godfrey V.L., Kuklin N.A., Bouley D.M., Thomas J., Kanangat S., Mucenski M.L. Lymphotoxin- $\alpha$ -deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. // *J. Immunol.* 1995. V. 155. № 4. P. 1685–1693.

15. Barger S.W., Hörster D., Furukawa K., Goodman Y., Kriegstein J., Mattson M.P. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca<sup>2+</sup> accumulation. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995. V. 92. № 20. P. 9328–32.

16. Barker V., Middleton G., Davey F., Davies A.M. TNF $\alpha$  contributes to the death of NGF-dependent neurons during development. // *Nat. Neurosci.* 2001. V. 4. № 12. P. 1194–1198.

17. Baune B.T., Wiede F., Braun A., Golledge J., Arolt V., Koerner H. Cognitive dysfunction in mice deficient for TNF- and its receptors // *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 2008. V. 147. № 7. P. 1056–1064.

18. Bazhenova E.Y., Kulikov A. V., Tikhonova M.A., Bazovkina D. V., Fursenko D. V., Popova N.K. On the association between lipopolysaccharide induced catalepsy and serotonin metabolism in the brain of mice genetically different in the predisposition to catalepsy // *Pharmacol. Ther.* 2013. V. 111. P. 71–75.

19. Beattie E.C., Stellwagen D., Morishita W., Bresnahan J.C., Ha B.K., Zastrow M. Von, Beattie M.S., Malenka R.C. Control of synaptic strength by glial TNF $\alpha$ . // *Science.* 2002. V. 295. № 5563. P. 2282–2285.

20. Bernardino L., Agasse F., Silva B., Ferreira R., Grade S., Malva J.O. Tumor necrosis factor- $\alpha$  modulates survival, proliferation, and neuronal differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures. // *Stem Cells.* 2008. V. 26. № 9. P. 2361–2371.

21. Bette M., Kaut O., Schäfer M.K.H., Weihe E. Constitutive expression of p55TNFR mRNA and mitogen-specific up-regulation of TNF $\alpha$  and p75TNFR mRNA in mouse brain // *J. Comp. Neurol.* 2003. V. 465. № 3. P. 417–430.

22. Bhaskar K., Maphis N., Xu G., Varvel N.H., Kokiko-Cochran O.N., Weick J.P., Staugaitis S.M., Cardona A., Ransohoff R.M., Herrup K., Lamb B.T. Microglial derived tumor necrosis factor- $\alpha$  drives Alzheimer's disease-related neuronal cell cycle events // *Neurobiol. Dis.*

2014. V. 62. P. 273–285.

23. Black R.A., Rauch C.T., Kozlosky C.J., Peschon J.J., Slack J.L., Wolfson M.F., Castner B.J., Stocking K.L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K.A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J.N., Johnson R.S., Paxton R.J., March C.J., Cerretti D.P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. // *Nature*. 1997. V. 385. № 6618. P. 729–733.

24. Bluthé R.-M., Layé S., Michaud B., Combe C., Dantzer R., Parnet P. Role of interleukin-1 $\beta$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice // *Eur. J. Neurosci*. 2000a. V. 12. № 12. P. 4447–4456.

25. Bluthé R.-M., Michaud B., Poli V., Dantzer R. Role of IL-6 in cytokine-induced sickness behavior: a study with IL-6 deficient mice // *Physiol. Behav*. 2000b. V. 70. № 3. P. 367–373.

26. Boka G., Anglade P., Wallach D., Javoy-Agid F., Agid Y., Hirsch E.C. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease // *Neurosci. Lett*. 1994. V. 172. № 1–2. P. 151–154.

27. Bradley J.R. TNF-mediated inflammatory disease // *J. Pathol*. 2008. № 214. P. 149–160.

28. Braun A.A., Skelton M.R., Vorhees C. V, Williams M.T. Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: Effects of anxiolytic and anxiogenic agents. // *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2011. V. 97. № 3. P. 406–415.

29. Bredow S., Guha-Thakurta N., Taishi P., Obal F.J., Krueger J.M. Diurnal variations of tumor necrosis factor alpha mRNA and alpha-tubulin mRNA in rat brain // *Neuroimmunomodulation*. 1997. V. 4. P. 84–90.

30. Brenner D., Blaser H., Mak T.W. Regulation of tumour necrosis factor signalling : live or let die // *Nat. Publ. Gr*. 2015. V. 15. № 6. P. 362–374.

31. Browning J.L., French L.E. Visualization of lymphotoxin-beta and lymphotoxin-beta receptor expression in mouse embryos. // *J. Immunol*. 2002. V. 168. № 10. P. 5079–5087.

32. Bruce-Keller A.J., Geddes J.W., Knapp P.E., McFall R.W., Keller J.N., Holtsberg F.W., Parthasarathy S., Steiner S.M., Mattson M.P. Anti-death properties of TNF against metabolic poisoning: Mitochondrial stabilization by MnSOD // *J. Neuroimmunol*. 1999. V. 93. № 1–2. P. 53–71.

33. Butler M.P., O'Connor J.J., Moynagh P.N. Dissection of tumor-necrosis factor- $\alpha$  inhibition of long-term potentiation (LTP) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early – but not late – phase LTP // *Neuroscience*. 2004. V.

124. № 2. P. 319–326.

34. Cacci E., Claasen J.H., Kokaia Z. Microglia-derived tumor necrosis factor- $\alpha$  exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro // *J. Neurosci. Res.* 2005. V. 80. № 6. P. 789–797.

35. Caldarone B.J., Zachariou V., King S.L. Rodent models of treatment-resistant depression // *Eur. J. Pharmacol.* 2015. V. 753. P. 51–65.

36. Camara M. Lou, Corrigan F., Jaehne E.J., Jawahar M.C., Anscomb H., Baune B.T. Tumor necrosis factor alpha and its receptors in behaviour and neurobiology of adult mice, in the absence of an immune challenge // *Behav. Brain Res.* 2015. V. 290. P. 51–60.

37. Camara M. Lou, Corrigan F., Jaehne E.J., Jawahar M.C., Anscomb H., Koerner H., Baune B.T. TNF-alpha and its receptors modulate complex behaviours and neurotrophins in transgenic mice // *Psychoneuroendocrinology.* 2013. V. 38. № 12. P. 3102–3114.

38. Cannella B., Sizing I.D., Benjamin C.D., Browning J.L., Raine C.S. Antibodies to lymphotoxin alpha (LT alpha) and LT beta recognize different glial cell types in the central nervous system. // *J. Neuroimmunol.* 1997. V. 78. № 1–2. P. 172–9.

39. Capuron L., Ravaud A., Miller A.H., Dantzer R. Baseline mood and psychosocial characteristics of patients developing depressive symptoms during interleukin-2 and/or interferon-alpha cancer therapy // *Brain. Behav. Immun.* 2004. V. 18. № 3. P. 205–213.

40. Caroff S.N., Mann S.C., Keck P.E.J., Francis A. Residual catatonic state following neuroleptic malignant syndrome. // *J. Clin. Psychopharmacol.* 2000. V. 20. № 2. P. 257–259.

41. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1975. V. 72. № 9. P. 3666–3670.

42. Cesuglio R., Faradji H., Gomez M.E., Jouvet M. Single unit recordings in the nuclei raphe dorsalis and magnus during the sleep-waking cycle of semi-chronic prepared cats // *Neurosci. Lett.* 1981. V. 24. № 2. P. 133–138.

43. Chan F.K., Chun H.J., Zheng L., Siegel R.M., Bui K.L., Lenardo M.J. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling // *Science* (80-. ). 2000. V. 288. P. 2351–2354.

44. Chan F.K.M. Three is better than one: Pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling // *Cytokine.* 2007. V. 37. № 2. P. 101–107.

45. Chertoff M., Paolo N. Di, Schoeneberg a, Depino a, Ferrari C., Wurst W., Pfizenmaier K., Eisel U., Pitossi F. Neuroprotective and neurodegenerative effects of the chronic expression of tumor necrosis factor alpha in the nigrostriatal dopaminergic circuit of adult mice // *Exp Neurol.* 2011. V. 227. № 2. P. 237–251.

46. Chung I.Y., Benveniste E.N. Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. // *J. Immunol.* 1990. V. 144. № 8. P. 2999–3007.
47. Citri A., Malenka R.C. Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms // *Neuropsychopharmacology.* 2008. V. 33. № 1. P. 18–41.
48. Clark I. a. How TNF was recognized as a key mechanism of disease // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007. V. 18. № 3–4. P. 335–343.
49. Constantinescu C.S., Farooqi N., O'Brien K., Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS) // *Br. J. Pharmacol.* 2011. V. 164. № 4. P. 1079–1106.
50. Copeland S., Warren H.S., Lowry S.F., Calvano S.E., Remick D. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005. V. 12. № 1. P. 60–67.
51. Côté F., Thévenot E., Fligny C., Fromes Y., Darmon M., Ripoché M.-A., Bayard E., Hanoun N., Saurini F., Lechat P., Dandolo L., Hamon M., Mallet J., Vodjdani G. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. V. 100. № 23. P. 13525–13530.
52. Coulon P., Budde T., Pape H.C. The sleep relay-the role of the thalamus in central and decentral sleep regulation // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2012. V. 463. № 1. P. 53–71.
53. Cryan J.F., Mombereau C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice // *Mol. Psychiatry.* 2004. V. 9. № 4. P. 326–357.
54. Cunningham A.J., Murray C.A., O'Neill L.A., Lynch M.A., O'Connor J.J. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumour necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. // *Neurosci. Lett.* 1996. V. 203. № 1. P. 17–20.
55. Daniels J. Catatonia: Clinical aspects and neurobiological correlates // *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 2009. V. 21. № 4. P. 371–380.
56. Dantzer R. Cytokine, sickness behaviour, and depression // *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2009. V. 29. № 2. P. 247–264.
57. Dantzer R., Kelley K.W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior // *Brain. Behav. Immun.* 2007. V. 21. № 2. P. 153–160.
58. Darko D.F., Miller J.C., Gallen C., White J., Koziol J., Brown S.J., Hayduk R., Atkinson J.H., Assmus J., Munnell D.T., Naitoh P., McCutchan J.A., Mitler M.M. Sleep electroencephalogram delta-frequency amplitude, night plasma levels of tumor necrosis factor alpha, and human immunodeficiency virus infection. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995. V.



92. № 26. P. 12080–12084.

59. Davis C.J., Krueger J.M. Sleep and cytokines // *Sleep Med. Clin.* 2012. V. 7. № 3. P. 517–527.

60. Deboer T., Fontana A., Tobler I. Tumor necrosis factor (TNF) ligand and TNF receptor deficiency affects sleep and the sleep EEG. // *J. Neurophysiol.* 2002. V. 88. P. 839–846.

61. Degterev A., Hitomi J., Gemscheid M., Ch'en I.L., Korkina O., Teng X., Abbott D., Cuny G.D., Yuan C., Wagner G., Hedrick S.M., Gerber S.A., Lugovskoy A., Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. // *Nat. Chem. Biol.* 2008. V. 4. № 5. P. 313–21.

62. Devin A., Cook A., Lin Y., Rodriguez Y., Kelliher M., Liu Z. The Distinct Roles of TRAF2 and RIP in IKK Activation by TNF-R1 // *Immunity.* 2000. V. 12. № 4. P. 419–429.

63. Devoino L., Morozova N., Cheido M. Participation of serotonergic system in neuroimmunomodulation: intrainmune mechanisms and the pathways providing an inhibitory effect // *Int. J. Neurosci.* 1988. V. 40. № 1–2. P. 111–128.

64. Dickson D.W. The pathogenesis of senile plaques. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1997. V. 56. № 4. P. 321–39.

65. Dickstein J.B., Moldofsky H., Lue F.A., Hay J.B. Intracerebroventricular injection of TNF- $\alpha$  promotes sleep and is recovered in cervical lymph // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 276. № 4 Pt 2. P. R1018–R1022.

66. Dixon A.K. Ethological strategies for defence in animals and humans: Their role in some psychiatric disorders // *Br. J. Med. Psychol.* 1998. V. 71. № 4. P. 417–445.

67. Doherty G.H. Developmental switch in the effects of TNF $\alpha$  on ventral midbrain dopaminergic neurons. // *Neurosci. Res.* 2007. V. 57. № 2. P. 296–305.

68. Duseja R., Heir R., Lewitus G.M., Altimimi H.F., Stellwagen D. Astrocytic TNF $\alpha$  regulates the behavioral response to antidepressants // *Brain. Behav. Immun.* 2015. V. 44. P. 187–194.

69. Eck M.J., Sprang S.R. The structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 29. P. 17595–17605.

70. Egashira T., Takayama F., Yamanaka Y., Takada K., Takeda H., Matsumiya T. Day/night variation of 5-hydroxyindole acetic acid concentration in rat cerebrospinal fluid after acute and long-term administration of a selective serotonin reuptake inhibitor, fluvoxamine // *Jpn J Pharmacol.* 2000. V. 83. № 4. P. 344–347.

71. Ermert M., Pantazis C., Duncker H.-R., Grimminger F., Seeger W., Ermert L. In situ localization of TNF $\alpha/\beta$ , TACE AND TNF receptors TNF-R1 and TNF-R2 in control and LPS-treated lung tissue. // *Cytokine.* 2003. V. 22. № 3. P. 89–100.

72. Fang J., Wang Y., Krueger J.M. Mice lacking the TNF 55 kDa receptor fail to sleep more after TNF $\alpha$  treatment // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. № 15. P. 5949–5955.
73. Feng P., Jyotaki M., Kim A., Chai J., Simon N., Zhou M., Bachmanov A.A., Huang L., Wang H. Regulation of bitter taste responses by tumor necrosis factor // *Brain. Behav. Immun.* 2015. V. 49. P. 32–42.
74. Fiers W. Tumor necrosis factor Characterization at the molecular, cellular and in vivo level // *FEBS Lett.* 1991. V. 285. № 2. P. 199–212.
75. Fiore M., Angelucci F., Alleva E., Branchi I., Probert L., Aloe L. Learning performances, brain NGF distribution and NPY levels in transgenic mice expressing TNF-alpha. // *Behav. Brain Res.* 2000. V. 112. № 1–2. P. 165–175.
76. Floyd R.A., Krueger J.M. Diurnal variation of TNF $\alpha$  in the rat brain // *Neuroreport.* 1997. V. 8. № 4. P. 915–918.
77. Fontaine V., Mohand-said S., Hanoteau N., Pfizenmaier K. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor necrosis factor (TNF) in retinal ischemia : Opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2 // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. P. 1–7.
78. Franklin C.M. Clinical experience with soluble TNF p75 receptor in rheumatoid arthritis. // *Semin. Arthritis Rheum.* 1999. V. 29. № 3. P. 172–181.
79. Fuller P.M., Gooley J.J., Saper C.B. Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback. // *J. Biol. Rhythms.* 2006. V. 21. № 6. P. 482–493.
80. Gerhard A., Pavese N., Hotton G., Turkheimer F., Es M., Hammers A., Eggert K., Oertel W., Banati R.B., Brooks D.J. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease // *Neurobiol. Dis.* 2006. V. 21. № 2. P. 404–412.
81. Gingrich J.A., Hen R. The broken mouse : the role of development , plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000. V. 10. № 1. P. 146–152.
82. Golan H., Levav T., Mendelsohn A., Huleihel M. Involvement of tumor necrosis factor alpha in hippocampal development and function // *Cereb. Cortex.* 2004. V. 14. № 1. P. 97–105.
83. Goodwin R.G., Anderson D., Jerzy R., Davis T., Brannan C.I., Copeland N.G., Jenkins N.A., Smith C.A. Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. // *Mol. Cell. Biol.* 1991. V. 11. № 6. P. 3020–3026.
84. Gould E., Tanapat P., McEwen B.S., Flügge G., Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. V. 95. № 6. P. 3168–3171.
85. Grell M., Douni E., Wajant H., Löhden M., Clauss M., Maxeiner B., Georgopoulos S.,

Lesslauer W., Kollias G., Pfizenmaier K., Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor // *Cell*. 1995. V. 83. № 5. P. 793–802.

86. Gutknecht L., Waider J., Kraft S., Kriegebaum C., Holtmann B., Reif A., Schmitt A., Lesch K.-P. Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in Tph2 knockout mice // *J. Neural Transm.* 2008. V. 115. № 8. P. 1127–1132.

87. Haase J., Brown E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression – A central role for the serotonin transporter? // *Pharmacol. Ther.* 2015. V. 147. P. 1–11.

88. Hale M.W., Raison C.L., Lowry C.A. Integrative physiology of depression and antidepressant drug action: Implications for serotonergic mechanisms of action and novel therapeutic strategies for treatment of depression // *Pharmacol. Ther.* 2013. V. 137. № 1. P. 108–118.

89. Hall B., Limaye A., Kulkarni A.B. Overview: Generation of gene knockout mice // *Current Protocols in Cell Biology*. : JohnWiley & Sons, Inc, 2009. . 1–17.

90. Hamon M., Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments // *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*. 2013. V. 45. P. 54–63.

91. Harms A.S., Lee J.-K., Nguyen T.A., Chang J., Ruhn K.M., Treviño I., Tansey M.G. Regulation of microglia effector functions by tumor necrosis factor signaling. // *Glia*. 2012. V. 60. № 2. P. 189–202.

92. Harrison F.E., Hosseini A.H., McDonald M.P. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks // *Behav. Brain Res.* 2009. V. 198. № 1. P. 247–251.

93. He P., Liu Q., Wu J., Shen Y. Genetic deletion of TNF receptor suppresses excitatory synaptic transmission via reducing AMPA receptor synaptic localization in cortical neurons // *FASEB J.* 2012. V. 26. P. 334–345.

94. Heesch F. van, Prins J., Korte-Bouws G.A.H., Westphal K.G.C., Lemstra S., Olivier B., Kraneveld A.D., Korte S.M. Systemic tumor necrosis factor-alpha decreases brain stimulation reward and increases metabolites of serotonin and dopamine in the nucleus accumbens of mice. // *Behav. Brain Res.* 2013. V. 253. P. 191–195.

95. Heldmann U., Thored P., Claassen J.H., Arvidsson A., Kokaia Z., Lindvall O. TNF- $\alpha$  antibody infusion impairs survival of stroke-generated neuroblasts in adult rat brain // *Exp. Neurol.* 2005. V. 196. № 1. P. 204–208.

96. Hensler J.G. Serotonin // *Basic Neurochemistry* / под ред. S.T. Brady et al. , 2012. . 300–322.

97. Hines D.J., Choi H.B., Hines R.M., Phillips A.G., MacVicar B.A. Prevention of LPS-induced microglia activation, cytokine production and sickness behavior with TLR4 receptor interfering peptides // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 3.
98. Hobson A.J. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. // *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1969. V. 26. № 6. P. 58.
99. Hof P.R. Comparative cytoarchitectonic atlas of the C57BL/6 and 129/Sv mouse brains. Amsterdam, New York: Elsevier, 2000. 275 p.
100. Idoval G. V., Alperina E.L., Cheido M.A. Contribution of brain dopamine, serotonin and opioid receptors in the mechanisms of neuroimmunomodulation: Evidence from pharmacological analysis // *Int. Immunopharmacol.* 2012. V. 12. № 4. P. 618–625.
101. Idriss H.T., Naismith J.H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). // *Microsc. Res. Tech.* 2000. V. 50. № 3. P. 184–195.
102. Imagawa S., Yamaguchi Y., Ogawa K., Obara N., Suzuki N., Yamamoto M., Nagasawa T. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome // *Respiration*. 2004. V. 71. № 1. P. 24–29.
103. Imamura K., Hishikawa N., Sawada M., Nagatsu T., Yoshida M., Hashizume Y. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains // *Acta Neuropathol.* 2003. V. 106. № 6. P. 518–526.
104. Iosif R.E., Ekdahl C.T., Ahlenius H., Pronk C.J.H., Bonde S., Kokaia Z., Jacobsen S.-E.W., Lindvall O. Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 38. P. 9703–9712.
105. Janelins M.C., Mastrangelo M.A., Oddo S., LaFerla F.M., Federoff H.J., Bowers W.J. Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. // *J. Neuroinflammation*. 2005. V. 2. № 1. P. 23.
106. Johansen C., Mose M., Ommen P., Bertelsen T., Vinter H., Hailfinger S., Lorscheid S., Schulze-Osthoff K., Iversen L. IκBζ is a key driver in the development of psoriasis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. V. 112. № 43. P. E5825–E5833.
107. Jones-Hall Y.L., Kozik A., Nakatsu C. Ablation of tumor necrosis factor is associated with decreased inflammation and alterations of the microbiota in a mouse model of inflammatory bowel disease // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 3.
108. Jouvet M. The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. // *Ergeb. Physiol.* 1972. V. 64. P. 166–307.
109. Kalthoff H., Roeder C., Brockhaus M., Thiele H.G., Schmiegel W. Tumor necrosis

factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 4. P. 2762–2766.

110. Kaneko M., Stellwagen D., Malenka R.C., Stryker M.P. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  mediates one component of competitive, experience-dependent plasticity in developing visual cortex // *Neuron*. 2008. V. 58. № 5. P. 673–680.

111. Karadağ Ö., Nakas D., Kalyoncu U., Akdoğan U., Kiraz S., Ertenli I. Effect of anti-TNF treatment on sleep problems in ankylosing spondylitis // *Rheumatol. Int.* 2012. V. 32. № 7. P. 1909–1913.

112. Kassiotis G., Kollias G. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. // *J. Exp. Med.* 2001. V. 193. № 4. P. 427–434.

113. Kaster M.P., Gadotti V.M., Calixto J.B., Santos A.R.S., Rodrigues A.L.S. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in mice // *Neuropharmacology*. 2012. V. 62. № 1. P. 419–426.

114. Kelley K.W., McCusker R.H. Getting nervous about immunity // *Semin. Immunol.* 2014. V. 26. № 5. P. 389–393.

115. Keohane A., Ryan S., Maloney E., Sullivan A.M., Nolan Y.M. Tumour necrosis factor- $\alpha$  impairs neuronal differentiation but not proliferation of hippocampal neural precursor cells: Role of Hes1 // *Mol. Cell. Neurosci.* 2010. V. 43. № 1. P. 127–135.

116. Kim H., Chen L., Lim G., Sung B., Wang S., McCabe M.F. Brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression // *J. Clin. Invest.* 2012. V. 122. № 8. P. 2940–2954.

117. Klintworth H., Garden G., Xia Z. Rotenone and paraquat do not directly activate microglia or induce inflammatory cytokine release // *Neurosci. Lett.* 2009. V. 462. № 1. P. 1–5.

118. Koella W.P. Neurohumoral aspects of sleep control. // *Biol. Psychiatry*. 1969. V. 1. № 2. P. 161–177.

119. Koella W.P., Czicman J. Mechanism of the EEG-synchronizing action of serotonin. // *Am. J. Physiol.* 1966. V. 211. № 4. P. 926–934.

120. Koella W.P., Feldstein A., Czicman J.S. The effect of para-chlorophenylalanine on the sleep of cats. // *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1968. V. 25. № 5. P. 481–490.

121. Köhler S., Cierpinsky K., Kronenberg G., Adli M. The serotonergic system in the neurobiology of depression: Relevance for novel antidepressants. // *J. Psychopharmacol.* 2016. V. 30. № 1. P. 13–22.

122. Koni P., Sacca R., Lawton P., Browning J.L., Ruddle N.H., Flavell R.A. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. // *Immunity*. 1997. V. 6. № 4. P. 491–500.
123. Körner H., Cook M., Riminton D.S., Lemckert F. a, Hoek R.M., Ledermann B., Köntgen F., Fazekas de St Groth B., Sedgwick J.D. Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue. // *Eur. J. Immunol.* 1997a. V. 27. № 10. P. 2600–2609.
124. Körner H., Riminton D.S., Strickland D.H., Lemckert F. a, Pollard J.D., Sedgwick J.D. Critical points of tumor necrosis factor action in central nervous system autoimmune inflammation defined by gene targeting. // *J. Exp. Med.* 1997b. V. 186. № 9. P. 1585–1590.
125. Krishnadas R., Nicol A., Sassarini J., Puri N., Burden a. D., Leman J., Combet E., Pimlott S., Hadley D., McInnes I.B., Cavanagh J. Circulating tumour necrosis factor is highly correlated with brainstem serotonin transporter availability in humans // *Brain. Behav. Immun.* 2016. V. 51. P. 29–38.
126. Krügel U., Fischer J., Radicke S., Sack U., Himmerich H. Antidepressant effects of TNF- $\alpha$  blockade in an animal model of depression // *J. Psychiatr. Res.* 2013. V. 47. № 5. P. 611–616.
127. Kubota T., Fang J., Guan Z., Brown R.A., Krueger J.M. Vagotomy attenuates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced sleep and EEG  $\delta$ -activity in rats // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2001. V. 280. № 4. P. R1213–R1220.
128. Kubota T., Li N., Guan Z., Brown R.A., Krueger J.M. Intrapreoptic microinjection of TNF- $\alpha$  enhances non-REM sleep in rats // *Brain Res.* 2002. V. 932. № 1–2. P. 37–44.
129. Kulikov A. V., Morozova M. V., Kulikov V.A., Kirichuk V.S., Popova N.K. Automated analysis of antidepressants' effect in the forced swim test // *J. Neurosci. Methods.* 2010. V. 191. № 1. P. 26–31.
130. Kulikov A. V, Fursenko D. V, Khotskin N. V, Bazovkina D. V, Kulikov V.A., Naumenko V.S., Bazhenova E.Y., Popova N.K. Spatial learning in the Morris water maze in mice genetically different in the predisposition to catalepsy: The effect of intraventricular treatment with brain-derived neurotrophic factor // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2014. V. 122. P. 266–272.
131. Kulikov A. V, Kozlachkova E.Y., Maslova G.B., Popova N.K. Inheritance of predisposition to catalepsy in mice. // *Behav. Genet.* 1993. V. 23. № 4. P. 379–384.
132. Kulikov A. V, Osipova D. V, Naumenko V.S., Terenina E., Mormède P., Popova N.K. A pharmacological evidence of positive association between mouse intermale aggression and brain serotonin metabolism // *Behav. Brain Res.* 2012. V. 233. № 1. P. 113–119.
133. Kulikov A. V, Popova N.K. Tryptophan hydroxylase 2 in seasonal affective disorder:

Underestimated perspectives? // *Rev. Neurosci.* 2015. V. 26. № 6. P. 679–690.

134. Kulikov A. V, Tikhonova M.A., Kulikov V.A. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting. // *J. Neurosci. Methods.* 2008. V. 170. № 2. P. 345–351.

135. Kulikova E.A., Bazovkina D.V., Antonov Y.V., Akulov A.E., Kulikov A.V., Kondaurova E.M. Alteration of the brain morphology and the response to the acute stress in the recombinant mouse lines with different predisposition to catalepsy // *Neurosci. Res.* 2016.

136. Kuprash D. V., Tumanov A. V., Liepinsh D.J., Koroleva E.P., Drutskaya M.S., Kruglov A.A., Shakhov A.N., Southon E., Murphy W.J., Tessarollo L., Grivennikov S.I., Nedospasov S. a. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches // *Eur. J. Immunol.* 2005. V. 35. № 5. P. 1592–1600.

137. Laflamme N., Rivest S. Effects of systemic immunogenic insults and circulating proinflammatory cytokines on the transcription of the inhibitory factor  $\kappa B\alpha$  within specific cellular populations of the rat brain // *J. Neurochem.* 1999. V. 73. № 1. P. 309–321.

138. Lapin I.P., Oxenkrug G.F. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect // *Lancet.* 1969. V. 293. № 7586. P. 132–136.

139. Lassmann H., Bruck W., Lucchinetti C.F. The immunopathology of multiple sclerosis: An overview // *Brain Pathology.* , 2007. . 210–218.

140. Lavicky J., Dunn A.J. Endotoxin administration stimulates cerebral catecholamine release in freely moving rats as assessed by microdialysis // *J. Neurosci. Res.* 1995. V. 40. № 3. P. 407–413.

141. Legler D.F., Micheau O., Doucey M.A., Tschopp J., Bron C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa B$  activation // *Immunity.* 2003. V. 18. № 5. P. 655–664.

142. Lieberman A.P., Pitha P.M., Shin H.S., Shin M.L. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989. V. 86. № 16. P. 6348–6352.

143. Linthorst A.C.E., Flachskamm C., Müller-Preuss P., Holsboer F., Reul J.M. Effect of bacterial endotoxin and interleukin-1 beta on hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioral activity, and free corticosterone levels: an in vivo microdialysis study. // *J. Neurosci.* 1995. V. 15. № 4. P. 2920–34.

144. Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology // *Cell.* 2001. V. 104. № 4. P. 487–501.

145. Lüscher C., Malenka R.C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD) // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. V. 4. № 6. P. 1–15.

146. Maes M. The cytokine hypothesis of depression: Inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression // *Neuroendocrinol. Lett.* 2008. V. 29. № 3. P. 287–291.
147. Maes M., Leonard B.E., Myint A.M., Kubera M., Verkerk R. The new «5-HT» hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to t // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2011. V. 35. № 3. P. 702–721.
148. Malynn S., Campos-Torres A., Moynagh P., Haase J. The pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  regulates the activity and expression of the serotonin transporter (SERT) in astrocytes // *Neurochem. Res.* 2013. V. 38. № 4. P. 694–704.
149. Manosso L.M., Neis V.B., Moretti M., Daufenbach J.F., Freitas A.E., Colla A.R., Rodrigues A.L.S. Antidepressant-like effect of  $\alpha$ -tocopherol in a mouse model of depressive-like behavior induced by TNF- $\alpha$  // *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 2013. V. 46. P. 48–57.
150. Marino M.W., Dunn a, Grail D., Inglese M., Noguchi Y., Richards E., Jungbluth a, Wada H., Moore M., Williamson B., Basu S., Old L.J. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997. V. 94. № 15. P. 8093–8098.
151. McAfoose J., Baune B.T. Evidence for a cytokine model of cognitive function // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2009. V. 33. № 3. P. 355–366.
152. McAfoose J., Koerner H., Baune B.T. The effects of TNF deficiency on age-related cognitive performance // *Psychoneuroendocrinology.* 2009. V. 34. № 4. P. 615–619.
153. McAlpine F.E., Lee J.-K., Harms A.S., Ruhn K.A., Blurton M., Hong J., Das P., Golde T.E., Laferla F.M., Oddo S., Blesch A., Tansey M.G. Inhibition of soluble TNF signalling in a mouse model of Alzheimers' disease prevents pre-plaque amyloid-associated neuropathology // *Neurobiol. Dis.* 2010. V. 34. № 1. P. 163–77.
154. McCusker R.H., Kelley K.W. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior // *J Exp Biol.* 2013. V. 216. № Pt 1. P. 84–98.
155. McGinty D., Szymusiak R. The sleep-wake switch: A neuronal alarm clock // *Nat. Med.* 2000. V. 6. № 5. P. 510–511.
156. McGinty D.J., Harper R.M. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats // *Brain Res.* 1976. V. 101. № 3. P. 569–575.
157. Miller A.H., Raison C.L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target // *Nat. Rev. Immunol.* 2016. V. 16. № 1. P. 22–34.
158. Milner L.C., Crabbe J.C. Three murine anxiety models: results from multiple inbred



strain comparisons. // *Genes. Brain. Behav.* 2008. V. 7. № 4. P. 496–505.

159. Mogi M., Harada M., Riederer P., Narabayashi H., Fujita K., Nagatsu T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. // *Neurosci. Lett.* 1994. V. 165. № 1–2. P. 208–210.

160. Montanez S., Daws L.C., Gould G.G., Frazer A. Serotonin (5-HT) transporter (SERT) function after graded destruction of serotonergic neurons // *J. Neurochem.* 2003. V. 87. № 4. P. 861–867.

161. Montgomery S.L., Bowers W.J. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2012. V. 7. № 1. P. 42–59.

162. Morin L.P. Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. // *Ann. Med.* 1999. V. 31. № 1. P. 12–33.

163. Mortensen R. Overview of gene targeting by homologous recombination. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2006. V. Chapter 23. P. Unit 23.1.

164. Moss R.B., Mercandetti A., Vojdani A. TNF-alpha and chronic fatigue syndrome. // *J. Clin. Immunol.* 1999. V. 19. № 5. P. 314–6.

165. Mössner R. Enhancement of serotonin transporter function by tumor necrosis factor alpha but not by interleukin-6 // *Neurochem. Int.* 1998. V. 33. № 3. P. 251–254.

166. Myint A.M., Kim Y.K. Network beyond IDO in psychiatric disorders: Revisiting neurodegeneration hypothesis // *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 2014. V. 48. P. 304–313.

167. Nedospasov S.A., Hirt B., Shakhov A.N., Dobrynin V.N., Kawashima E., Accollo R.S., Jongeneel C. V. The genes for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) are tandemly arranged on chromosome 17 of the mouse // *Nucleic Acids Res.* 1986. V. 14. № 19. P. 7713–7725.

168. Nedwin G.E., Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Smith D., Jarrett-Nedwin J., Pennica D., Goeddel D. V., Gray P.W. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: Structure, homology and chromosomal localization // *Nucleic Acids Res.* 1985. V. 13. № 17. P. 6361–6373.

169. Nishimura M., Mizuta I., Mizuta E., Yamasaki S., Ohta M., Kaji R., Kuno S. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with sporadic Parkinson's disease // *Neurosci. Lett.* 2001. V. 311. № 0304–3940 LA–eng PT–Journal Article. P. 1–4.

170. O'Connor T., Frei N., Sponarova J., Schwarz P., Heikenwalder M., Aguzzi A. Lymphotoxin, but not TNF, is required for prion invasion of lymph nodes. // *PLoS Pathog.* 2012. V. 8. № 8.

171. Ofengeim D., Yuan J. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of

inflammation and cell death. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. V. 14. № 11. P. 727–36.

172. Oishi N., Chen J., Zheng H.W., Hill K., Schacht J., Sha S.H. Tumor necrosis factor-alpha-mutant mice exhibit high frequency hearing loss // *JARO - J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 2013. V. 14. № 6. P. 801–811.

173. Oldreive C.E., Doherty G.H. Effects of tumour necrosis factor-alpha on developing cerebellar granule and Purkinje neurons in vitro // *J. Mol. Neurosci.* 2010. V. 42. № 1. P. 44–52.

174. Olivier B. Serotonin: A never-ending story // *Eur. J. Pharmacol.* 2015. V. 753. P. 2–18.

175. Oppenheim J.J., Feldmann M., Durum S.K. *Cytokine Reference: Receptors.* : Academic Press, 2001.

176. Oxenkrug G.F. Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan - Kynurenine metabolism // *Annals of the New York Academy of Sciences.* , 2010. . 1–14.

177. Pack A.I., Galante R.J., Maislin G., Cater J., Metaxas D., Lu S., Zhang L., Smith R. Von, Kay T., Lian J., Svenson K., Peters L.L. Novel method for high-throughput phenotyping of sleep in mice // *Physiol. Genomics.* 2007. V. 28. № 2. P. 232–238.

178. Paganelli R., Di A., Patricelli L., Ripani F., Sparvieri E., Faricelli R., Iarlori C., Porreca E., Di M., Abate G. Proinflammatory cytokines in sera of elderly patients with dementia : levels in vascular injury are higher than those of mild-moderate Alzheimer's disease patients // *Exp. Gerontol.* 2002. V. 37. P. 257–263.

179. Palin K., Bluthé R.-M., McCusker R.H., Moos F., Dantzer R., Kelley K.W. TNF $\alpha$ -Induced Sickness Behavior in Mice with Functional 55 kD TNF Receptors is Blocked by Central IGF-I // *J. Neuroimmunol.* 2007. V. 187. № 1–2. P. 55–60.

180. Palin K., McCusker R.H., Strle K., Moos F., Dantzer R., Kelley K.W. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced sickness behavior is impaired by central administration of an inhibitor of c-jun N-terminal kinase // *Psychopharmacology (Berl).* 2008. V. 197. № 4. P. 629–635.

181. Paparrigopoulos T., Tzavellas E., Ferentinos P., Mourikis I., Liappas J. Catatonia as a risk factor for the development of neuroleptic malignant syndrome: report of a case following treatment with clozapine. // *World J. Biol. Psychiatry.* 2009. V. 10. № 1. P. 70–3.

182. Park K.M., Bowers W.J. Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction // *Cell Signal.* 2011. V. 22. № 7. P. 977–983.

183. Pasparakis M., Alexopoulou L., Episkopou V., Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response // *J. Exp. Med.* 1996. V. 184. № 4. P. 1397–1411.

184. Pennica D., Hayflick J.S., Bringman T.S., Palladino M.A., Goeddel D. V. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1985. V. 82. № 18. P. 6060–6064.
185. Petit-Demouliere B., Chenu F., Bourin M. Forced swimming test in mice: A review of antidepressant activity // *Psychopharmacology (Berl)*. 2005. V. 177. № 3. P. 245–255.
186. Porsolt R.D., Pichon M. Le, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments // *Nature*. 1977. V. 266. № 5604. P. 730–732.
187. Pousset F., Fournier J., Legoux P., Keane P., Shire D., Soubrie P. Effect of serotonin on cytokine mRNA expression in rat hippocampal astrocytes. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1996. V. 38. № 1. P. 54–62.
188. Probert L., Akassoglou K., Pasparakis M., Kontogeorgos G., Kollias G. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995. V. 92. № 24. P. 11294–11298.
189. Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review // *Eur. J. Pharmacol.* 2003. V. 463. № 1–3. P. 3–33.
190. Puig M.V., Gullledge A.T. Serotonin and Prefrontal Cortex Function: Neurons, Networks, and Circuits // *Mol. Neurobiol.* 2011. P. 1–16.
191. Purves D., Fitzpatrick D., Katz L.C., Lamantia A.S., McNamara J.O., Williams S.M., Augustine G.J. *Neuroscience*. : Sinauer Associates, 2001.
192. Qin L., He J., Hanes R.N., Pluzarev O., Hong J.-S., Crews F.T. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. // *J. Neuroinflammation*. 2008. V. 5. P. 10.
193. Raaby L., Langkilde A., Kjellerup R.B., Vinter H., Khatib S.H., Hjuler K.F., Johansen C., Iversen L. Changes in mRNA expression precede changes in microRNA expression in lesional psoriatic skin during treatment with adalimumab // *Br. J. Dermatol.* 2015. V. 173. № 2. P. 436–447.
194. Rahighi S., Ikeda F., Kawasaki M., Akutsu M., Suzuki N., Kato R., Kensche T., Uejima T., Bloor S., Komander D., Randow F., Wakatsuki S., Dikic I. Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF- $\kappa$ B activation // *Cell*. 2009. V. 136. № 6. P. 1098–1109.
195. Ray S., Britschgi M., Herbert C., Takeda-Uchimura Y., Boxer A., Blennow K., Friedman L.F., Galasko D.R., Jutel M., Karydas A., Kaye J.A., Leszek J., Miller B.L., Minthon L., Quinn J.F., Rabinovici G.D., Robinson W.H., Sabbagh M.N., So Y.T., Sparks D.L., Tabaton M., Tinklenberg J., Yesavage J.A., Tibshirani R., Wyss-Coray T. Classification and prediction of

clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. // *Nat. Med.* 2007. V. 13. № 11. P. 1359–1362.

196. Roberts N.J., Zhou S., Diaz L.A., Holdhoff M. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. // *Oncotarget.* 2011. V. 2. № 10. P. 739–51.

197. Robson L., Gower A.J., Kendall D.A., Marsden C.A. Age-related behavioural, neurochemical and radioligand binding changes in the central 5-HT system of Sprague-Dawley rats // *Psychopharmacology (Berl).* 1993. V. 113. № 2. P. 274–281.

198. Rodriguez M., Zoecklein L., Papke L., Gamez J., Denic A., Macura S., Howe C. Tumor necrosis factor  $\alpha$  is reparative via TNFR1 in the hippocampus and via TNFR2 in the striatum after virus-induced encephalitis // *Brain Pathol.* 2009. V. 19. № 1. P. 12–26.

199. Roth K.A., D'Sa C. Apoptosis and brain development. // *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 2001. V. 7. № 4. P. 261–266.

200. Rothe J., Bluethmann H., Gentz R., Lesslauer W., Steinmetz M. Genomic organization and promoter function of the murine tumor necrosis factor receptor beta gene. // *Mol. Immunol.* 1993. V. 30. № 2. P. 165–75.

201. Rousselet E., Callebert J., Parain K., Joubert C., Hunot S., Hartmann A., Jacque C., Perez-Diaz F., Cohen-Salmon C., Launay J.-M., Hirsch E.C. Role of TNF-alpha receptors in mice intoxicated with the parkinsonian toxin MPTP. // *Exp. Neurol.* 2002. V. 177. № 1. P. 183–192.

202. Samii A., Nutt J.G., Ransom B.R. Parkinson's disease // *Lancet.* 2004. V. 363. P. 1783–1793.

203. Santee S.M., Owen-Schaub L.B. Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 35. P. 21151–21159.

204. Santello M., Bezzi P., Volterra A. TNF $\alpha$  controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus // *Neuron.* 2011. V. 69. № 5. P. 988–1001.

205. Saper C.B., Chou T.C., Scammell T.E. The sleep switch: Hypothalamic control of sleep and wakefulness // *Trends Neurosci.* 2001. V. 24. № 12. P. 726–731.

206. Schwartz J.R.L.L., Roth T. Neurophysiology of sleep and wakefulness : basic science and clinical implications // *Curr. Neuropharmacol.* 2008. V. 6. № 4. P. 367–378.

207. Sedel F. Macrophage-derived tumor necrosis factor, an early developmental signal for motoneuron death // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 9. P. 2236–2246.

208. Selmaj K., Raine C.S., Cannella B., Brosnan C.F. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. // *J. Clin. Invest.* 1991. V. 87. № 3. P. 949–54.

209. Sharief M.K., Hentges R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. // *N. Engl. J. Med.* 1991. V. 325. № 7. P.

467–472.

210. Shelton R.C., Claiborne J., Sidoryk-Wegrzynowicz M., Reddy R., Aschner M., Lewis D.A., Mirnics K. Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression // *Mol Psychiatry*. 2011. V. 16. № 7. P. 751–762.

211. Sherin J.E., Elmquist J.K., Torrealba F., Saper C.B. Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. // *J. Neurosci*. 1998. V. 18. № 12. P. 4705–4721.

212. Shoham S., Davenne D., Cady A.B., Dinarello C.A., Krueger J.M. Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 enhance slow-wave sleep // *Am. J. Physiol*. 1987. V. 253. № 1. P. R142–R149.

213. Shoji H., Takao K., Hattori S., Miyakawa T. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. // *Mol. Brain*. 2016. V. 9. № 1. P. 11.

214. Simen B.B., Duman C.H., Simen A.A., Duman R.S. TNF $\alpha$  Signaling in Depression and Anxiety: Behavioral Consequences of Individual Receptor Targeting // *Biol. Psychiatry*. 2006. V. 59. P. 775–785.

215. Simola N., Morelli M., Carta A.R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease // *Neurotox. Res*. 2007. V. 11. № 3–4. P. 151–167.

216. Smeyne R.J., Jackson-Lewis V. The MPTP model of Parkinson's disease // *Mol. Brain Res*. 2005. V. 134. № 1. P. 57–66.

217. Sriram K., Matheson J.M., Benkovic S.A., Miller D.B., Luster M.I., O'Callaghan J.P. Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. // *FASEB J*. 2002. V. 16. № 11. P. 1474–1476.

218. Sriram K., Matheson J.M., Benkovic S.A., Miller D.B., Luster M.I., O'Callaghan J.P. Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF-alpha. // *FASEB J*. 2006. V. 20. № 6. P. 670–682.

219. Stellwagen D., Beattie E.C., Seo J.Y., Malenka R.C. Differential Regulation of AMPA Receptor and GABA Receptor Trafficking by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  // *J. Neurosci*. 2005. V. 25. № 12. P. 3219–3228.

220. Stellwagen D., Malenka R.C. Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$  // *Nature*. 2006. V. 440. P. 1054–1059.

221. Sterniczuk R., Antle M.C., Laferla F.M., Dyck R.H. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes // *Brain Res*. 2010. V. 1348. P. 149–155.

222. Takahashi S., Kapás L., Fang J., Krueger J.M. An anti-tumor necrosis factor antibody

suppresses sleep in rats and rabbits // *Brain Res.* 1995a. V. 690. № 2. P. 241–244.

223. Takahashi S., Kapás L., Seyer J.M., Wang Y., Krueger J.M. Inhibition of tumor necrosis factor attenuates physiological sleep in rabbits // *Neuroreport.* 1996. V. 7. № 2. P. 642–646.

224. Takahashi S., Tooley D.D., Kapás L., Fang J., Seyer J.M., Krueger J.M. Inhibition of tumor necrosis factor in the brain suppresses rabbit sleep // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 1995b. V. 431. № 2. P. 155–160.

225. Tancredi V., D'Arcangelo G., Grassi F., Tarroni P., Palmieri G., Santoni a., Eusebi F. Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices // *Neurosci. Lett.* 1992. V. 146. № 2. P. 176–178.

226. Taylor-Gjevre R.M., Gjevre J.A., Nair B. V, Skomro R.P., Lim H.J. Improved sleep efficiency after anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  therapy in rheumatoid arthritis patients // *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2011. V. 3. № 5. P. 227–233.

227. Tikhonova M.A., Kulikov A. V., Bazovkina D. V., Kulikova E.A., Tsybko A.S., Bazhenova E.Y., Naumenko V.S., Akulov A.E., Moshkin M.P., Popova N.K. Hereditary catalepsy in mice is associated with the brain dysmorphology and altered stress response // *Behav. Brain Res.* 2013. V. 243. № 1. P. 53–60.

228. Trulson M.E., Jacobs B.L. Raphe unit activity in freely moving cats: Correlation with level of behavioral arousal // *Brain Res.* 1979. V. 163. № 1. P. 135–150.

229. Tun M.M.N., Aoki K., Senba M., Buerano C.C., Shirai K., Suzuki R., Morita K., Hayasaka D. Protective role of TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-2 in mice infected with the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 5344.

230. Turner N.A., Mughal R.S., Warburton P., O'Regan D.J., Ball S.G., Porter K.E. Mechanism of TNF $\alpha$ -induced IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones. // *Cardiovasc. Res.* 2007. V. 76. № 1. P. 81–90.

231. Turrigiano G.G. The self-tuning neuron: Synaptic scaling of excitatory synapses. // *Cell.* 2008. V. 135. № 3. P. 422–435.

232. Twyver H. Van. Sleep patterns of five rodent species // *Physiol. Behav.* 1969. V. 4. № 6. P. 901–905.

233. Ursin R., Bjorvatn B., Sommerfelt L., Underland G. Increased waking as well as increased synchronization following administration of selective 5-HT uptake inhibitors to rats // *Behav. Brain Res.* 1989. V. 34. № 1–2. P. 117–130.

234. Vgontzas A.N., Zoumakis E., Lin H.-M., Bixler E.O., Trakada G., Chrousos G.P. Marked decrease in sleepiness in patients with sleep apnea by etanercept, a tumor necrosis factor-

alpha antagonist. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004. V. 89. № 9. P. 4409–4413.

235. Vgontzas A.N., Zoumakis M., Papanicolaou D.A., Bixler E.O., Prolo P., Lin H.M., Vela-Bueno A., Kales A., Chrousos G.P. Chronic insomnia is associated with a shift of interleukin-6 and tumor necrosis factor secretion from nighttime to daytime // *Metabolism.* 2002. V. 51. № 7. P. 887–892.

236. Vorhees C. V., Williams M.T. Assessing spatial learning and memory in rodents // *ILAR J.* 2014. V. 55. № 2. P. 310–332.

237. Wahner A.D., Sinsheimer J.S., Bronstein J.M., Ritz B. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of Parkinson disease. // *Arch. Neurol.* 2007. V. 64. № 6. P. 836–40.

238. Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. // *Cell Death Differ.* 2003. V. 10. № 1. P. 45–65.

239. Wajant H., Scheurich P. TNFR1-induced activation of the classical NF- $\kappa$ B pathway // *FEBS J.* 2011. V. 278. № 6. P. 862–876.

240. Walker F.R. A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptake inhibitors: Do these drugs possess anti-inflammatory properties and how relevant is this in the treatment of depression? // *Neuropharmacology.* 2013. V. 67. P. 304–317.

241. Walther D.J., Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform // *Biochem. Pharmacol.* 2003. V. 66. № 9. P. 1673–1680.

242. Weder N.D., Muralee S., Penland H., Tampi R.R. Catatonia: A review // *Ann. Clin. Psychiatry.* 2008. V. 20. № 2. P. 97–107.

243. Wertz I.E., O'Rourke K.M., Zhou H., Eby M., Aravind L., Seshagiri S., Wu P., Wiesmann C., Baker R., Boone D.L., Ma A., Koonin E. V., Dixit V.M. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- $\kappa$ B signalling // *Nature.* 2004. V. 430. № 7000. P. 694–699.

244. Willner P. Animal models of depression: an overview. // *Pharmacol. Ther.* 1990. V. 45. № 3. P. 425–455.

245. Willner P., Mitchell P.J. The validity of animal models of predisposition to depression. // *Behav. Pharmacol.* 2002. V. 13. № 3. P. 169–188.

246. Winzen R., Wallach D., Kemper O., Resch K., Holtmann H. Selective up-regulation of the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor and its mRNA by TNF and IL-1. // *J. Immunol.* 1993. V. 150. № 10. P. 4346–4353.

247. Wong G., Goldshmit Y., Turnley A.M. Interferon- $\gamma$  but not TNF $\alpha$  promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells // *Exp. Neurol.* 2004. V. 187. № 1. P. 171–177.

248. Wright A., Reiley W.W., Chang M., Jin W., Lee A.J., Zhang M., Sun S.C. Regulation of early wave of germ cell apoptosis and spermatogenesis by deubiquitinating enzyme CYLD // *Dev. Cell.* 2007. V. 13. № 5. P. 705–716.
249. Xia Z.-P., Sun L., Chen X., Pineda G., Jiang X., Adhikari A., Zeng W., Chen Z.J. Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. // *Nature.* 2009. V. 461. № 7260. P. 114–9.
250. Yamada K., Iida R., Miyamoto Y., Saito K., Sekikawa K. Neurobehavioral alterations in mice with a targeted deletion of the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene : implications for emotional behavior // 2000. V. 111. P. 131–138.
251. Yoshida H., Peterfi Z., García-García F., Kirkpatrick R., Yasuda T., Krueger J.M. State-specific asymmetries in EEG slow wave activity induced by local application of TNF $\alpha$  // *Brain Res.* 2004. V. 1009. № 1–2. P. 129–136.
252. Zepelin H., Siegel J.M., Tobler I. Mammalian sleep // *Principles and Practice of Sleep Medicine.* , 2005. . 91–100.
253. Zhao X., Bausano B., Pike B.R., Newcomb-Fernandez J.K., Wang K.K.W., Shohami E., Ringger N.C., Deford S.M., Anderson D.K., Hayes R.L. TNF- $\alpha$  Stimulates caspase-3 Activation and Apoptotic Cell Death in Primary Septo-Hippocampal Cultures // *J. Neurosci. Res.* 2001. V. 64. № 2. P. 121–131.
254. Zhu C.-B., Blakely R.D., Hewlett W.A. The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. // *Neuropsychopharmacology.* 2006. V. 31. № 10. P. 2121–2131.
255. Zielinski M.R., Dunbrasky D.L., Taishi P., Souza G., Krueger J.M. Vagotomy attenuates brain cytokines and sleep induced by peripherally administered tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide in mice // *Sleep.* 2013. V. 36. № 8. P. 1227–1238.



Приложение 1. Сравнение режима содержания животных и используемых методик в разных работах на мышах с нокаутом TNF.

Таблица 19. Режим содержания животных. НД – нет данных, ОП – тест «открытое поле», ПКЛ – тест «приподнятый крестообразный лабиринт», ВЛМ – тест «водный лабиринт Морриса», НВТ – hole-board test, тест «арена с отверстиями».

Статья	Yamada et al., 2000	Golan et al., 2002	(1) Baune et al., 2008 (2) Camara et al., 2013 (3) Camara et al., 2015 (4) McAfoose et al., 2009	Наша работа
Смена день/ночь	12:12, рассвет в 9:00	12:12	12:12, рассвет в 7:00	11:13, рассвет в 01:30
SPF-статус	НД	НД	(1, 4) – SPF (2, 3) – НД	SPF
Время проведения экспериментов	НД	ОП, ПКЛ, НВТ – НД ВЛМ 9:00 – 16:00	8:00 – 16:00	16:00 – 19:00
Возраст мышей	НД	ОП, ПКЛ, НВТ – НД ВЛМ – 90 дней	(1) 2-2,5 мес (2) 3 мес (3) 6 мес (4) 3, 6 и 12 мес	2 и 4 мес

Таблица 20. Список поведенческих процедур, используемых в каждой работе.

Yamada et al., 2000	Golan et al., 2002	(1) Baune et al., 2008 (2) Camara et al., 2013 (3) Camara et al., 2015 (4) McAfoose et al., 2009	Наша работа
Тест нахождения воды Суточный ритм спонтанной двигательной активности Ротарод Открытое поле Принудительной плавание Приподнятый крестообразный лабиринт	Открытое поле Приподнятый крестообразный лабиринт Hole board exploration Водный лабиринт Морриса	Двигательная активность в домашней клетке Открытое поле Hole board exploration Приподнятый О-образный лабиринт Социальность Тест Барнс Принудительное плавание	Потребление пищи и воды, двигательная активность в домашней клетке Открытое поле Приподнятый крестообразный лабиринт Принудительное плавание Водный лабиринт Морриса

Таблица 21. Сравнение протоколов тестов, применяемых в различных работах.

	Yamada et al., 2000	Golan et al., 2002	(1) Baune et al., 2008 (2) Camara et al., 2013 (3) Camara et al., 2015 (4) McAfoose et al., 2009	Наша работа
<b>Открытое поле</b>				
Размеры арены	Квадратная 90x90x30	Круглая, Ø 65, стенки 30см	Квадратная 40x40	Круглая, Ø 60 см, стенки 30 см
Время тестирования	10 минут	2 минуты	5 минут	5 минут
Параметры	Пройденный путь, стойки, чистки	Время чисток, время стоек, отношение времени центр/периметр, количество дефекаций	Пройденный путь	Пройденный путь, время и исследованная площадь центра и периметра, количество дефекаций, количество и длительность вертикальных стоек и чисток.
<b>Приподнятый лабиринт</b>				
Форма	Крестообразный	Крестообразный	О-образный	Крестообразный
Размер	Рукава 25см, стенки 20см, 50см над землей	Рукава 40см длиной, стенки 15см, 40см над землей	Ø50 см, ширина 5см, 40см над землей	Рукава 30см, стенки 20см 60см над уровнем земли
Время теста	5 минут	5 минут	5 минут	5 минут
Параметры	Количество заходов и время в открытых и закрытых рукавах	Открытые vs закрытые рукава	Время в открытых рукавах	Время в открытых, закрытых рукавах и центре, исследованная площадь открытых и закрытых рукавов, пройденный путь
<b>Принудительное плавание</b>				

Размер	20см высота, Ø 8см	Не тестировали	4л, Ø20см	Высота 30см, Ø15см
Вода	8см глубина, t 25		20см глубина, t 23-24	15см глубина, t 24- 26
Время	15минут		6минут	6 мин, считали последние 4 мин
<b>Обучение и память</b>				
Тест	Не исследовали	Водный лабиринт Морриса	Тест Барнса	Водный лабиринт Морриса
Размеры арены		Ø70см, 30см стенки, заполнен молоком, t 25-26	Круглая платформа Ø91см	Ø110см, 25см стенки, вода забеленная сухим молоком, t 25-26
Размер «выхода»		Платформа Ø10см, 0,5-1см ниже уровня поверхности в одном из секторов	20 отверстий по периметру, в одном из которых «выход»	Платформа Ø5см, 0,5-1см ниже уровня поверхности в одном из секторов
Визуальные ориентиры		Несколько дальних	Нет	Ближний в секторе с платформой
Предобучен ие		Да, 10с на платформе за день до начала	Нет	Нет
Количество дней обучения		3	4	4
Количество попыток в день		6	3	3
Максимальн ая длительност ь попытки		1 мин	3 мин	1 мин
Перерыв между попытками		30 минут	15 минут	15 секунд
Исследован ие «выхода» между попытками		нет	Если мышь не находила выход, на 2 мин	Да, 15 сек, или до окончания времени попытки
Место посадки		Произвольно в одну из четвертей	Центр	В одну из четвертей, где нет платформы

Контрольная проба		На 3ий день после обучения, платформу убрали, сажали в сектор противопоставленный, 1 мин	5 день, положение выхода меняли на 90 градусов, центр 3 мин	5 день, убранная платформа, сажали в центр, 1 мин
Параметры обучения		Среднее время нахождения платформы для каждого дня	Среднее время нахождения платформы за все четыре дня	Среднее время нахождения платформы, пройденный путь, суммарное расстояние до платформы, скорость для каждого дня
Параметры контрольной пробы		Время, проведенное в целевом секторе	Латентное время нахождения старого местоположение «выхода»	Время, проведенное в целевом и противопоставленном секторах