

ФУРСЕНКО ДАРИЯ ВИКТОРОВНА

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

03.03.01 физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Новосибирск – 2017

Работа выполнена в секторе генетических коллекций neuropathologies Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

**Научный руководитель – Александр Викторович Куликов**, доктор биологических наук, заведующий сектором генетических коллекций neuropathologies ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН, г. Новосибирск.

**Официальные оппоненты:**

**Евгения Валерьевна Маркова**, доктор медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией нейроиммунологии ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск;

**Софья Николаевна Пантелеева**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории поведенческой экологии сообществ ФГБНУ «Институт систематики и экологии животных» СО РАН, г. Новосибирск.

**Ведущая организация –** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва.

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.014.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4, тел. (383)335-98-01, факс (383)335-97-54, эл. почта: dissovet@physiol.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИФФМ» и на сайте <http://www.physiol.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



В.Н. Мельников

## 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., 1997; 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 полученных ранее нокаутных линий 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 значимость 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 (Уппсала, Швеция 2015), FENS Featured Regional Meeting 2015 (Салоники, Греция 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).

**Структура и объем работы.** Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, список цитируемой литературы (255 источников), приложение. Работа изложена на 93 страницах, содержит 9 оригинальных рисунков и 21 таблицу.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **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 по фактору некроза опухоли (КО), созданных российскими учеными (Kuprash et al., 2005) и мышах линии C57Bl/6 (WT), на основе которой был получен данный нокаут, в возрасте 2 и 4 месяцев. Все животные имели SPF-статус на протяжении всего эксперимента. 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.

### **Тестирование поведения в домашней клетке**

Измерения суточной динамики двигательной активности (м/час), сна (мин/час), потребления воды (мл/день) и пищи (г/день) в домашней клетке проводили на программно-аппаратном комплексе PhenoMaster (TSE Systems, Германия) согласно инструкциям производителя.

### **Поведенческие тесты**

Тестирование поведения мышей в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «принудительное плавание», «щипковая каталепсия» и «водный лабиринт Морриса» проводили с помощью программно-аппаратного комплекса EthoStudio согласно ранее опубликованным протоколам (Kulikov et al., 2008; 2010; 2014; Хоцкин и др., 2014).

### **Магнитно-резонансная томография**

Прижизненные исследования морфологических различий в размерах мозга у животных проводили на горизонтальном томографе с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, BioSpec 117/16 USR, Германия). Изображения мозга получали в трех проекциях и, с помощью программного

обеспечения ROI, измеряли размеры структур мозга: сагиттальная проекция: таламус, мозолистое тело, гипофиз, мозжечок; аксиальная проекция: желудочек, гиппокамп, промежуточный мозг, гипофиз; коронарная проекция: стриатум, кора, гиппокамп, средний мозг. Размеры структур выражали в % от размера соответствующего среза.

### **Нейрохимические исследования**

Уровень серотонина и 5-ГИУК в коре, гиппокампе, стриатуме и среднем мозге определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и выражали в нг на мг белка, измеренного по Брэдфорду.

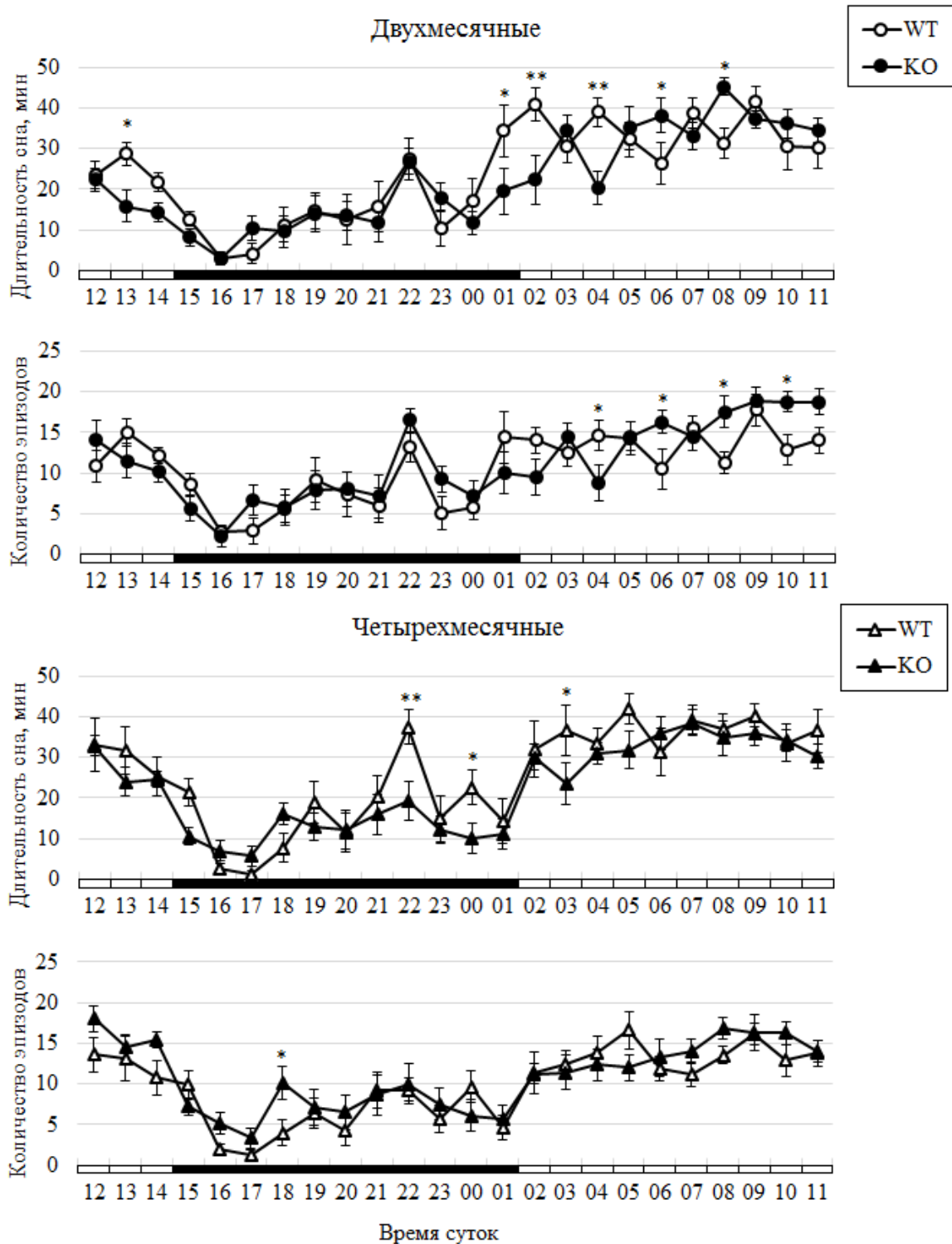
### **Статистическая обработка**

Все данные выражали в виде средних значений  $\pm$  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.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Влияние нокаута гена *Tnf* на сон**

Было показано достоверное влияние генотипа на длительность ( $F(1,28)=8.87$ ,  $p<.01$ ) и количество эпизодов ( $F(1,28)=5.96$ ,  $p<.05$ ) сна, кроме того было показано достоверное влияние времени суток ( $F(23,644)=27.31$ ,  $p<.001$ ;  $F(23,644)=18.33$ ,  $p<.001$ ) на данные параметры и его взаимодействие с генотипом ( $F(23,644)=1.91$ ,  $p<.01$ ;  $F(23,644)=1.68$ ,  $p<.05$ ). Мыши с дефицитом TNF имели меньшую среднюю длительность сна и большее количество эпизодов сна по сравнению с мышами дикого типа (WT:  $25.02 \pm 0.63$ ,  $10.27 \pm 0.26$ ; KO:  $22.38 \pm 0.63$ ,  $11.18 \pm 0.26$ ) (Рисунок 1).



**Рисунок 1.** Суточная динамика длительности (мин/час) и количества эпизодов сна для мышей с нокаутом гена *Tnf* (KO) и дикого типа (WT) в возрасте 2 и 4 месяцев (WT 2 месяца N=8, WT 4 месяца N=8, KO 2 месяца N=8, KO 4 месяца N=8). Каждая точка соответствует длительности (мин) и числу эпизодов сна за час. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  vs WT.



Это согласуется с литературными данными о том, что TNF является сомногенной субстанцией. Однако обнаруженные изменения проявлялись по-разному в возрасте двух и 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 возрасте четырех месяцев КО меньше спят в темное время суток, а в светлое время суток практически не отличаются от WT. Можно предположить, что смещение периодов активности у мышей КО связано с незавершенностью процессов формирования мозга, что видно по результатам томографического исследования (см. ниже).

### **Влияние нокаута гена *Tnf* на двигательную активность, потребление пищи и воды**

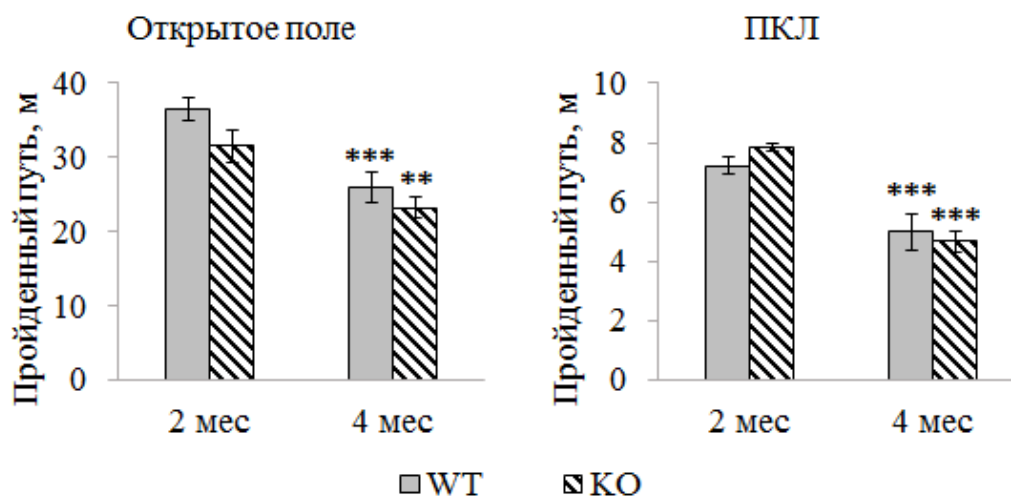
Не было обнаружено достоверного влияния нокаута гена *Tnf* на двигательную активность в домашней клетке ( $F(1,27)=2.70$ ,  $p>.05$ ), в тестах «открытое поле» (ОП) ( $F(1,36)=4.05$ ,  $p=.052$ ) и «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) ( $F<1$ ). Однако мы обнаружили достоверное уменьшение пройденного пути с возрастом в тестах ОП ( $F(1,36)=24.49$ ,  $p<.001$ ) и ПКЛ ( $F(1,32)=59.08$ ,  $p<.001$ ) у мышей обеих линий (Рисунок 2).

Нокаут гена *Tnf* не повлиял на суточное потребленной воды (WT: 2мес:  $2.73 \pm 0.37$  мл/сутки, 4мес:  $2.71 \pm 0.33$  мл/сутки; КО: 2мес:  $2.82 \pm 0.42$  мл/сутки, 4мес:  $2.64 \pm 0.61$  мл/сутки) и пищи (WT: 2мес:  $2.86 \pm 0.42$  г/сутки, 4мес:  $2.56 \pm 0.35$  г/сутки; КО: 2мес:  $3.30 \pm 0.13$  г/сутки, 4мес:  $2.99 \pm 0.36$  г/сутки) в домашней клетке ни в одном из возрастов ( $F<1$  для всех факторов).

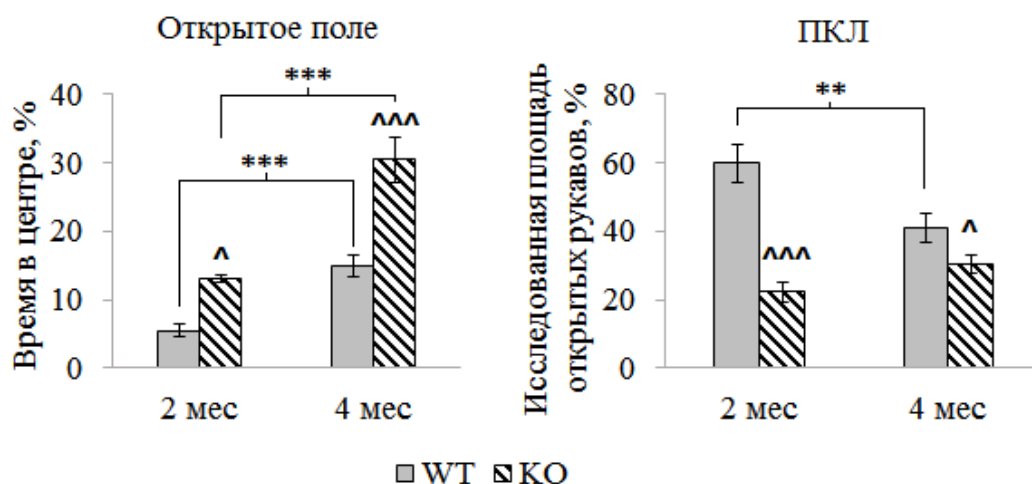
Данные результаты свидетельствуют об отсутствии или крайне незначительной роли TNF в регуляции двигательной активности и аппетита.

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

Неоднозначные результаты были получены по влиянию нокаута гена *Tnf* на тревожность. С одной стороны, в тесте ОП мыши КО и в два, и в четыре месяца проводят больше времени в центре арены, что можно интерпретировать как снижение тревожности, с другой стороны в тесте ПКЛ исследованная площадь открытого рукава у них меньше (Рисунок 3), что можно интерпретировать как повышенную тревожность (Milner & Crabbe, 2008; Prut & Belzung, 2003).



**Рисунок 2.** Пройденный путь (м) в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) у мышей с нокаутом гена *Tnf* (КО) и дикого типа (WT) 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). \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$  vs 2 мес.



**Рисунок 3.** Время в центре в тесте «открытое поле» (%) и исследованная площадь открытых рукавов в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (%) у мышей с нокаутом гена *Tnf* (КО) и дикого типа (WT) 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). \* $p < .05$ , \*\*\* $p < .001$  vs 2 мес;  $\wedge p < .01$ ,  $\wedge\wedge p < .001$  vs WT.

Данные различия могут быть объяснены тем, что в открытом поле стрессор (открытое освещенное пространство) не достаточно интенсивен. Так, освещенность поля в тесте ОП составляет 300 люкс и сходна с освещенностью в домашней клетке в светлое время. Можно предположить, что мыши привыкли к такой освещенности и она не является для них стрессором. В то же время, в ПКЛ мыши сталкиваются с незнакомой им угрозой – высотой и

испытывают к ней страх. В литературных данных тоже наблюдается рассогласование касательно влияния нокаута гена *Tnf* на тревожность мышей.

Количество дефекаций в тесте ОП у КО было увеличено, что говорит об усилении эмоциональности у этих мышей. Длительность умывания у КО тоже 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 (Таблица 1).

**Таблица 1.** Средние значения  $\pm$  ошибка среднего для параметров теста «открытое поле» у мышей с нокаутом гена *Tnf* (КО) и дикого типа (WT) в возрасте 2 и 4 месяцев.

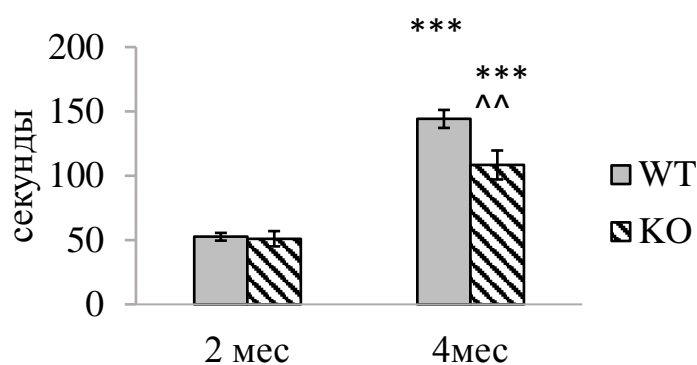
		WT		КО	
		2 мес	4 мес	2 мес	4 мес
Дефекации		0.38 $\pm$ 0.18 N=8	0.17 $\pm$ 0.11 N=12	1.38 $\pm$ 0.53 N=8	2.33 $\pm$ 0.48 <sup>^^</sup> N=12
	Умыв. Количество	1.75 $\pm$ 0.16 N=8	3.00 $\pm$ 0.63 N=12	1.63 $\pm$ 0.60 N=8	1.92 $\pm$ 0.40 N=12
Ср. длит.		1.70 $\pm$ 0.44 N=8	2.03 $\pm$ 0.43 N=12	0.64 $\pm$ 0.32 N=8	2.55 $\pm$ 0.64 <sup>*</sup> N=12
	Вертик. стойки	Количество	39.00 $\pm$ 4.07 N=8	21.25 $\pm$ 3.58 <sup>**</sup> N=12	44.50 $\pm$ 4.31 N=8
Ср. длит.		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 <sup>** ^</sup> N=12

\* $p < .05$ , \*\*\* $p < .001$  vs 2 мес; ^ $p < .05$ , ^^ $p < .01$ , ^^ $p < .001$  vs WT.

### **Влияние нокаута гена *Tnf* на депрессивно-подобное поведение в тесте «принудительное плавание»**

Было показано влияние возраста животных ( $F(1,34)=73.68$ ,  $p < .001$ ) и нокаута ( $F(1,34)=4.63$ ,  $p < .05$ ) на время неподвижности в тесте «принудительное плавание» (Рисунок 4). Увеличение неподвижности с возрастом может быть связано с возрастным уменьшением двигательной активности мышей, а не с увеличением депрессивно-подобного состояния. В возрасте 2 месяцев мыши не различались по времени неподвижности, что может быть связано с проявлением у нокаутных мышей реакции каталептического замирания, которая маскирует антидепрессантный эффект нокаута у молодых животных (см. ниже). Но в возрасте четырех месяцев

уменьшение времени неподвижности у КО по сравнению с WT связано с антидепрессантным эффектом нокаута гена *Tnf*, что согласуется с литературными данными о роли TNF в механизме депрессии. Показано, что введение TNF увеличивает, а введение его антител – уменьшает время неподвижности мышей в тесте «принудительное плавание» (Kaster et al., 2012).



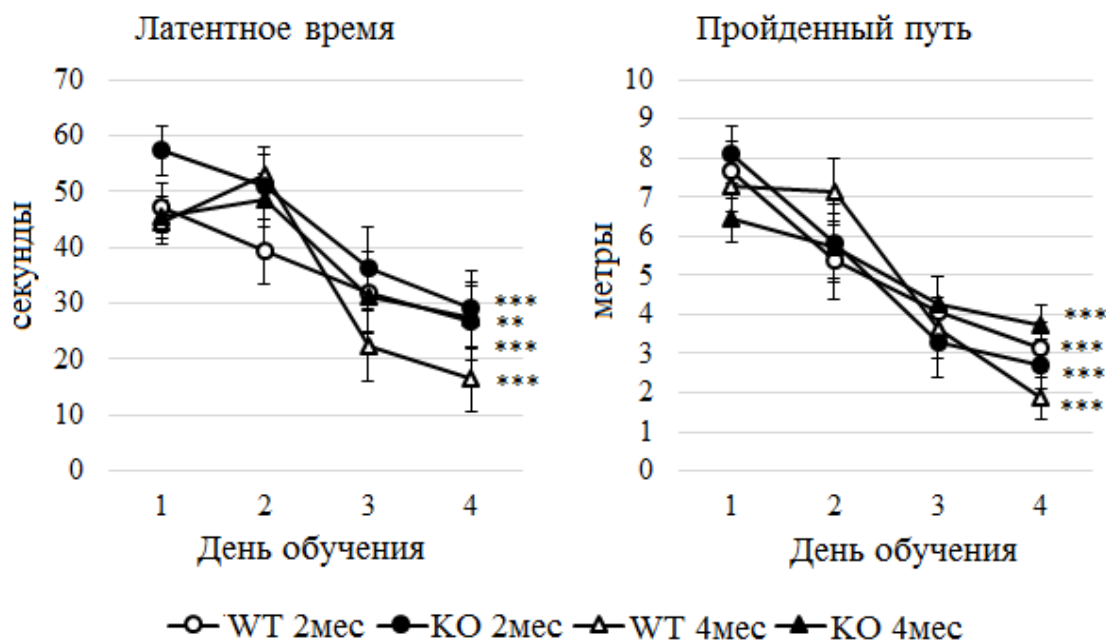
**Рисунок 4.** Время неподвижности в тесте «принудительное плавание» (с) (WT 2 месяца N=8, WT 4 месяца N=12, КО 2 месяца N=8, КО 4 месяца N=12). \*\*\* $p < .001$  vs 2 мес; ^^ $p < .01$  vs WT.

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

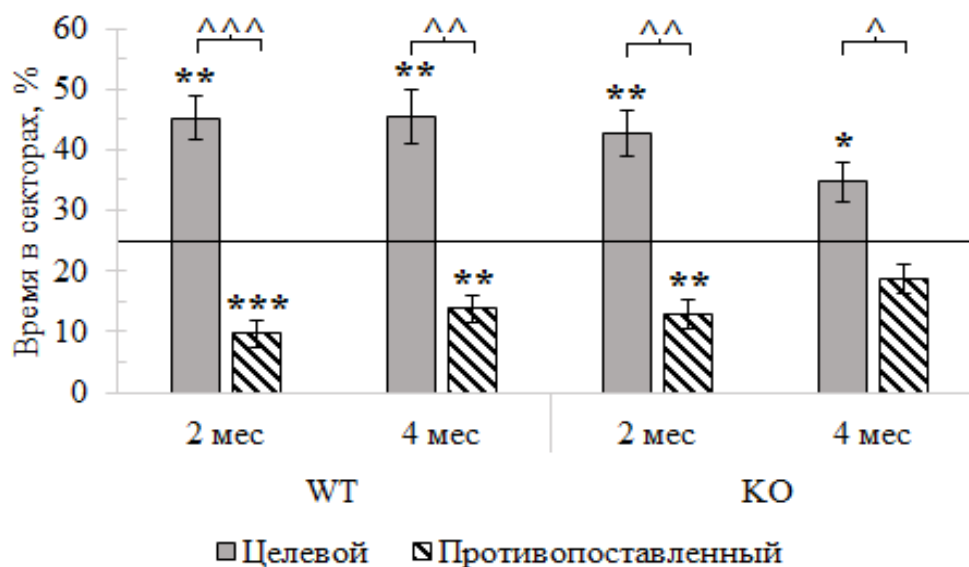
Мы показали, что мыши WT и КО обоих возрастов одинаково хорошо обучались в тесте «водный лабиринт Морриса» (значения F-критерия для фактора день обучения: латентное время  $F(3,105)=34.29$ ,  $p < .001$ ; пройденный путь  $F(1,105)=45.07$ ,  $p < .001$ ): на четвертый день по сравнению с первым у всех групп мышей уменьшались показатели латентного времени нахождения платформы и пройденного пути до платформы (Рисунок 5). Все группы мышей одинаково хорошо воспроизводили выученную информацию: на пятый день все группы животных проводили достоверно больше времени в целевом секторе, где раньше находилась платформа, по сравнению с противопоставленным и по сравнению со случайным распределением (25%) (Рисунок 6). Данные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния TNF на пространственное обучение и память у мышей.

### Влияние нокаута гена *Tnf* на каталепсию

В тесте «щипковая каталепсия» среди мышей дикого типа как в два, так и в четыре месяца не было найдено ни одного каталептика, но среди мышей с нокаутом по *Tnf* в возрасте 2 месяцев 46% проявляли реакцию каталептического замирания ( $\chi^2=6.24$ ,  $p < .05$ ; двусторонний Фишер  $p < .05$ ) со средней длительностью замирания  $25.51 \pm 4.89$  секунд ( $F(1,21)=20.67$ ,  $p < .001$ ) (Рисунок 7). К возрасту 4 месяцев реакция щипковой каталепсии у мышей КО исчезала.

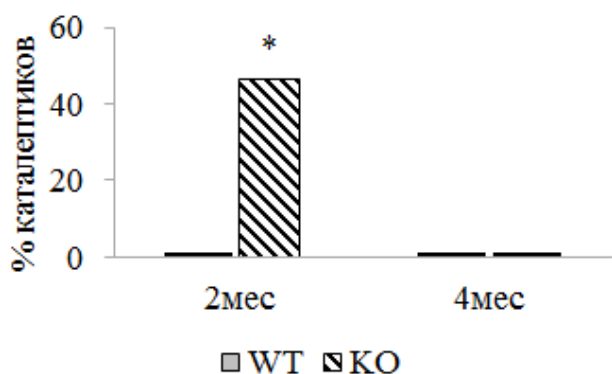


**Рисунок 5.** Динамика изменения латентного времени нахождения платформы (с) и пройденного пути (м) во время обучения в тесте «водный лабиринт Морриса» у мышей с нокаутом гена *Tnf* (KO) и дикого типа (WT) в возрасте 2 и 4 месяцев (WT 2 месяца N=8, WT 4 месяца N=12, KO 2 месяца N=8, KO 4 месяца N=12). \*\*  $p < .01$ , \*\*\*  $p < .001$  vs первый день.



**Рисунок 6.** Время (%), проведенной в целевом и противопоставленном секторах на пятый день теста «водный лабиринт Морриса» у мышей с нокаутом гена *Tnf* (KO) и дикого типа (WT) в возрасте 2 и 4 месяцев (WT 2 месяца N=8, WT 4 месяца N=12, KO 2 месяца N=8, KO 4 месяца N=12). \*  $p < .05$ ,

\*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$  vs 25% (случайное нахождение животного в данном секторе);  $\wedge p < .05$ ,  $\wedge\wedge p < .01$ ,  $\wedge\wedge\wedge p < .001$  vs противопоставленный сектор.



**Рисунок 7.** Процент каталептиков в тесте «щипковая катаlepsия» (WT 2 месяца N=10, WT 4 месяца N=7, КО 2 месяца N=13, КО 4 месяца N=7). \* $p < .05$  двусторонний Фишер.

### Влияние нокаута гена *Tnf* на морфологию мозга

В возрасте двух и четырех месяцев не было обнаружено различий по площадям срезов, на которых были измерены структуры ( $F < 1$ ). Однако продолжают процессы реорганизации некоторых структур: достоверное влияние возраста было показано для таламуса и мозжечка на сагиттальной ( $F(1,24)=6.12$ ,  $p < .05$ ;  $F(1,24)=7.19$ ,  $p < .05$ ), гипофиза на аксиальной ( $F(1,24)=14.91$ ,  $p < .001$ ) и гиппокампа на коронарной проекции ( $F(1,22)=15.81$ ,  $p < 0.001$ ). Размер гипофиза уменьшается, а размер гиппокампа увеличивается к четырехмесячному возрасту как у мышей WT ( $p < .01$ ,  $p < .05$ ), так и у КО ( $p < .05$ ,  $p < .01$ ) (Таблица 2). Только у мышей WT размер мозжечка уменьшается к возрасту 4 месяца ( $p < .05$ ), в то время как у мышей КО его размер остается на уровне двухмесячного возраста. Напротив, размер таламуса не отличается у мышей дикого типа в возрасте двух и четырех месяцев, в то время как у КО размер таламуса достоверно меньше в четырехмесячном возрасте по сравнению с двухмесячным ( $p < .05$ ). Поскольку таламус участвует в регуляции сна, то возможно различия в его размерах связаны с различной динамикой сна двухмесячных и четырехмесячных КО.

Было показано достоверное влияние линии на размер гипофиза на сагиттальной проекции ( $F(1,23)=6.41$ ,  $p < .05$ ): в возрасте 2 месяцев, но не в возрасте 4 месяцев, размер гипофиза был меньше у КО по сравнению WT ( $p < .01$ ) (Таблица 2). Ранее в нашей лаборатории было показано, что у мышей линий с предрасположенностью к катаlepsии размер гипофиза на сагиттальной проекции меньше по сравнению с животными устойчивой к катаlepsии линии (Kulikova et al., 2016; Tikhonova et al., 2013). В этой работе было показано, что мыши КО проявляют предрасположенность к щипковой

каталепсии в возрасте 2 месяцев, но не в возрасте четырех, что подтверждает ассоциацию размера гипофиза с каталепсией.

Результаты томографического исследования свидетельствуют о том, что у мышей обеих линий происходят возрастные процессы формирования мозга, однако у WT и КО они отличаются, что, вероятно, отражается на поведении мышей.

**Таблица 2.** 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	5.81 $\pm$ 0.18	5.90 $\pm$ 0.08	5.48 $\pm$ 0.12*
		N=8	N=6	N=8	N=6
	Гипофиз	0.85 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.06	0.67 $\pm$ 0.02^^	0.72 $\pm$ 0.04
		N=7	N=6	N=8	N=6
	Мозжечок	12.60 $\pm$ 0.23	11.80 $\pm$ 0.36 *	12.54 $\pm$ 0.10	12.06 $\pm$ 0.25
		N=8	N=6	N=8	N=6
<i>axial</i> -2.055 мм	Гипофиз	3.19 $\pm$ 0.13	2.67 $\pm$ 0.15**	3.06 $\pm$ 0.09	2.57 $\pm$ 0.16 *
		N=8	N=6	N=8	N=6
<i>coronal</i> 2 мм	Гиппокамп	13.25 $\pm$ 0.21	14.12 $\pm$ 0.35*	12.51 $\pm$ 0.25	13.82 $\pm$ 0.27**
		N=6	N=6	N=8	N=6

\* $p < .05$  \*\* $p < .01$  vs 2 мес, ^^ $p < .01$  vs WT.

### Изменения в серотониновой системе мозга у мышей с нокаутом гена *Tnf*

В возрасте 4 месяцев у мышей КО концентрации серотонина в коре и гиппокампе выше, чем у мышей WT (Таблица 3). Известно, что клинически эффективные антидепрессанты увеличивают уровень серотонина и уменьшают время неподвижности в тесте «принудительное плавание» (Naase & Brown, 2015; Petit-Demouliere et al., 2005). В нашей работе уменьшение времени неподвижности в тесте «принудительное плавание» ассоциировано с увеличением уровня серотонина в коре и гиппокампе, что можно рассматривать как свидетельство антидепрессантного эффекта дефицита TNF на уровне 5-HT системы головного мозга мышей.

**Таблица 3.** Средние значения  $\pm$  ошибка среднего уровня серотонина, 5-ГИУК (5-гидрокси-индолуксусной кислоты) и их отношения в коре, гиппокампе, стриатуме и среднем мозге у мышей с нокаутом гена *Tnf* (КО) (N=6) и дикого типа (WT) (N=6) в возрасте 4 месяца.

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

### 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», «приподнятый крестообразный лабиринт», 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 месяца 46% мышей с нокаутом гена *Tnf* проявляли реакцию каталептического замирания, но в возрасте 4 месяца 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 ПУБЛИКАЦИЙ

1. 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. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2014. Т.100. С.36-44.
  2. Фурсенко Д.В., Хоцкин Н.В., Куликов В.А., Куликов А.В. Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом по фактору некроза опухоли. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. Т.19. № 4. С.74-82.
  3. Kulikova E, Bazovkina D, Akulov A, Tsybko A, Fursenko D, Kulikov A, Naumenko V, Ponimaskin E, Kondaurova E. Alterations of pharmacological and behavioral responses in recombinant mouse line with an increased predisposition to catalepsy // Brit J Pharmacol. 2016. V.173. N.13. P. 2147-2161.
- 
1. Фурсенко, Д.В. Влияние нокаута по фактору некроза опухоли на поведение и метаболизм биогенных аминов мозга. / Д.В. Фурсенко, Н.В. Хоцкин // В кн.: Симбиоз-Россия 2014: материалы VII Всероссийского конгресса молодых биологов. Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2014. С. 227.
  2. Fursenko, D.V. The effect of tumor necrosis factor alpha deficiency on behavior and serotonergic system in mice / Fursenko, D.V., Hotski, N.V., Kulikova E.A. // 17th Annual Genes, Brain & Behaviour Meeting. Evolutionary Biology Centre Uppsala University, Sweden. 2015. P. 42.
  3. Fursenko, D.V. Deficiency of tumor necrosis factor alpha causes cataleptic immobility and changes in brain morphology and biochemistry / Fursenko, D., Khotskin, N., Kulikova, E., Bazovkina, D., Kulikov, A. // FENS Featured Regional Meeting 2015.