

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

НЕЙРОНАУКИ

DOI: 10.7868/S0869813918070018

**ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ  
НА ПОВЕДЕНИЕ И ДОФАМИНОВУЮ СИСТЕМУ  
МОЗГА У МЫШЕЙ**

© Д. В. Базовкина,<sup>1</sup> Д. В. Фурсенко,<sup>1</sup> А. В. Першина,<sup>2</sup> Н. В. Хоцкин,<sup>1</sup>  
Е. Ю. Баженова,<sup>1</sup> А. В. Куликов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия  
E-mail: daryabazovkina@gmail.com

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия

Фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) является важным модулятором функции центральной нервной системы. В данной работе исследовался эффект нокаута по гену фактора некроза опухоли на двигательную активность, тревожность и состояние дофаминовой системы мозга у мышей. Были использованы самцы мышей линии C57Bl/6 (дикий тип) и линии C57Bl/6-Tnf<sup>-/-</sup> (с нокаутом гена фактора некроза опухоли, TNF KO), полученной на основе генома C57Bl/6. В тесте «открытое поле» эти линии не отличались по длине пройденного пути, но мыши TNF KO проводили больше времени в центре арены и демонстрировали более высокий уровень вертикальных стоек, что говорит о сниженном уровне тревожности у этих животных по сравнению с диким типом. Кроме этого, у мышей TNF KO наблюдалось увеличение уровня мРНК гена, кодирующего дофаминовый D2-рецептор, снижение уровня дофамина в черной субстанции, а также уменьшение уровня мРНК гена, кодирующего дофаминовый D1-рецептор, в гиппокампе. Результаты свидетельствуют о влиянии нокаута по фактору некроза опухоли на тревожное поведение и дофаминовую систему мозга у мышей.

*Ключевые слова:* фактор некроза опухоли, дофамин, дофаминовые рецепторы, экспрессия генов, мозг, нокаут.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 7. С. 745—756. 2018

*D. V. Bazovkina,<sup>1</sup> D. V. Fursenko,<sup>1</sup> A. V. Pershina,<sup>2</sup> N. V. Khotskin,<sup>1</sup> E. Y. Bazhenova,<sup>1</sup> A. V. Kulikov.<sup>1</sup> INFLUENCE OF DEFICIENCY OF TUMOR NECROSIS FACTOR ON BEHAVIOR AND BRAIN DOPAMINE SYSTEM IN MICE. <sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: daryabazovkina@gmail.com; <sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia.*

The tumor necrosis factor (TNF) is an important modulator of central nervous system function. In this paper, the effect of deficiency of the tumor necrosis factor on locomotor activity, anxiety and the state of the brain dopamine system in mice was studied. Males of C57Bl/6 (wild type) and C57Bl/6-Tnf<sup>-/-</sup> (TNF KO, with tumor necrosis factor knockout, derived from the C57Bl/6 genome) mouse strains, were used. In the open field test, mice of these

strains did not differ in the length of the travelled path, but TNF KO mice spent more time in the center of the arena and showed a higher level of rearings, that indicates a decreased level of anxiety in these animals compared to the wild type. In addition, TNF KO mice demonstrated the augmentation of mRNA level of the gene encoding the dopamine D2 receptor and the reduction of the dopamine level in the substance nigra, as well as the decrease in mRNA level of the gene encoding the dopamine D1 receptor in the hippocampus. The results indicate the effect of knockout of the tumor necrosis factor on anxiety behavior and the dopamine system of the brain in mice.

*Key words:* tumor necrosis factor, dopamine, dopamine receptors, gene expression, brain, knockout, mice

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N. 7. P. 745—756. 2018

Фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) — это важный провоспалительный цитокин, представитель одноименного семейства. Он продуцируется как макрофагами на периферии [8], так и микроглией и астроцитами в центральной нервной системе (ЦНС) [21]. При активации иммунной системы уровень TNF в организме возрастает, в том числе в ЦНС [5, 26]. По данным литературы, этот цитокин является одним из посредников между нервной и иммунной системами. При воспалительном процессе TNF участвует в регуляции не только иммунного ответа [22, 27], но и так называемого «болезненного поведения» («sickness behavior»), которое включает в себя снижение двигательной активности, потерю веса, подавление аппетита [6, 20]. Повышенный уровень TNF в крови и спинномозговой жидкости наблюдается при депрессии [15], болезни Альцгеймера [33] и Паркинсона [30].

Дофаминовая система мозга участвует в регуляции различных физиологических процессов, включая поведение, нейроэндокринные функции, иммунные реакции [11, 35]. Показана важная роль дофамина в патофизиологии таких расстройств ЦНС, как паркинсонизм [36], шизофрения, депрессия [18] и тревожность [38]. Дофаминовые рецепторы (D1-D5) являются трансмембранными G-белок-связанными клеточными рецепторами. Наиболее изученными являются D1- и D2-рецепторы, которые вовлечены в регуляцию широкого спектра поведенческих реакций. Нужно отметить, что D1-рецепторы локализованы исключительно постсинаптически на дофамин-рецептивных клетках, в то время как D2-рецепторы присутствуют не только на постсинаптических мембранах клеток, но и на пресинаптических мембранах дофаминергических нейронов, что позволяет рецепторам данного типа участвовать в регуляции функциональной активности дофаминовой системы мозга по механизму обратной связи [4, 16].

TNF играет важную роль в регуляции дофаминовой системы мозга. Так, в работах на культурах клеток было показано, что TNF влияет на дифференциацию дофаминергических нейронов [14]. Показано, что повышенная экспрессия TNF в черной субстанции оказывает токсический эффект на дофаминергические нейроны, приводя в дальнейшем к развитию паркинсонизма [13]. Примечательно, что ингибирование TNF замедляет динамику потери дофаминергических нейронов в черной субстанции и развитие моторных нарушений [19, 29].

Нокаут животных по какому-либо гену является удобной моделью для изучения роли продукта этого гена в жизнедеятельности организма. В настоящее время существует несколько линий мышей с нокаутом по TNF [22, 27, 34], на которых было показано влияние нокаута гена *Tnf* на тревожность, депрессивноподобное поведение [9, 10], когнитивные способности [17, 28], но эти данные немногочисленны и несколько противоречивы. Только в одной работе были

исследованы уровни катехоламинов в мозге у мышей с нокаутом по TNF, при этом не было найдено изменений уровней дофамина и его метаболитов в изученных авторами структурах мозга [37]. До сих пор не был исследован эффект нокаута по TNF на экспрессию в мозге генов, кодирующих дофаминовые рецепторы. Российскими учеными была получена новая линия с нокаутом гена *Tnf*, которая отличается от полученных ранее нокаутных линий сниженным уровнем нейтрофилов и лимфоцитов, а также полным отсутствием Пейеровых бляшек [25]. Таким образом, данная линия является более корректной моделью для изучения влияния дефицита TNF на поведение и ЦНС.

Целью данной работы было исследование влияния нокаута по гену, кодирующему TNF, на поведение и состояние дофаминовой системы мозга. Для этого у самцов мышей дикого типа (WT, линия C57Bl/6) и нокаутных по гену *Tnf* (линия C57Bl/6-*Tnf*<sup>-/-</sup>, TNF KO) были изучены: 1) выраженность двигательной активности и параметров тревожного поведения в тесте «открытое поле»; 2) содержание дофамина и его метаболитов ДОФУК (3,4-диоксифенилуксусной кислоты) и ГВК (гомованилиновой кислоты) в коре, стриатуме и черной субстанции; 3) уровни мРНК генов, кодирующих дофаминовые D1- и D2-рецепторы, в коре, гиппокампе, стриатуме и черной субстанции.

## МЕТОДИКА

*Животные.* Эксперименты проводились на половозрелых самцах (12—14 недель,  $25 \pm 2$  г) линий C57Bl/6 (дикий тип WT,  $n = 14$ ) и C57Bl/6-*Tnf*<sup>-/-</sup> (TNF KO,  $n = 15$ ). Мыши TNF KO были получены методом *Cre/loxP* рекомбинации на основе инбредной линии C57Bl/6 в Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН под руководством академика РАН С. А. Недоспасова [25]. В настоящее время данная линия поддерживается в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010). После отсадки от матерей в возрасте 4 недель самцы содержались по 6 особей в клетках (35×25×15 см) в стандартных условиях вивария (температура 20—22 °С, влажность 50—60%, световой цикл 12:12, стандартный корм и вода без ограничений). Для снижения влияния группового эффекта за 2 дня до начала тестирования животных рассаживали по одному в клетках того же размера. Содержание животных, тестирование и забой проводили в соответствии с Инструкцией по содержанию и использованию лабораторных животных (NIH Publication № 80-23, США). Были сделаны все усилия для снижения числа экспериментальных животных и уменьшения их страдания.

В первой серии экспериментов тестировали поведение в тесте «открытое поле», на следующий день животных декапитировали, на холоде выделяли кору, гиппокамп, стриатум и черную субстанцию, образцы ткани замораживали в жидком азоте и хранили при  $-70$  °С до процедуры выделения РНК. Во второй серии экспериментов животных декапитировали, на холоде выделяли кору, стриатум и черную субстанцию, образцы ткани замораживали в жидком азоте и хранили при  $-70$  °С до процедуры определения дофамина и его метаболитов.

Тест «открытое поле» проводили в аппарате, состоящем из круглой арены (40 см в диаметре), окруженной пластиковым бортиком 25 см высотой и освещенной через матовый пол двумя галогеновыми лампами по 25 Вт ка-

жда. Использование измерения в проходящем свете обеспечивает максимально возможный контраст между животным белой окраски и белой ареной [24]. Мышь помещали около бортика и в течение 5 мин ее движения автоматически трассировали с помощью цифровой видеокамеры (Sony, Япония), расположенной в 80 см над ареной и присоединенной к IBM компьютеру через интерфейс IEEE1394. Двигательную активность (пройденный путь) и время нахождения в центре (20 см в диаметре) оценивали с помощью программы EthoStudio [24]. Число вертикальных стоек на задние лапки считали вручную.

*Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии* определяли содержание дофамина и его метаболитов ДОФУК (3,4-диоксифенилуксусной кислоты) и ГВК (гомованилиновой кислоты). На льду пробу переносили в стеклянный гомогенатор, приливали 0.6 М  $\text{HClO}_4$  в объеме 200 мкл для фронтальной коры, 300 мкл для стриатума и черной субстанции и гомогенизировали до однородного состояния. В чистую пробирку на 0.5 мл переносили 180 мкл гомогената и центрифугировали 15 мин при 4 °С и 14 000 об/мин для осаждения белка. Отбирали супернатант и разбавляли *milliQ* водой в 2 раза. Оставшийся осадок хранили при –20 °С для последующего определения белка методом Брэдфорда.

Система для определения уровня моноаминов и их метаболитов состояла из колонки Luna C18(2) (размер частиц 5 мкм, L × I.D. 75×4.6 мм, Phenomenex, США) с электрохимическим детектором (750 мВ, DECADE II™ Electrochemical-Detector; Antec, Нидерланды) и стеклоглеродной ячейкой (VT-03 ячейка 3 мм GC sb; Antec, Нидерланды), контролера СВМ-20А, насоса LC-20AD, проточно-го дегазатора DGU-20A5R и устройства автоматической подачи проб SIL-20А (Shimadzu Corporation, Япония). Мобильная фаза содержала 6.53 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 мкл 0.5 М  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 150 мг 1-октансульфоната натрия (Sigma, США) и метанол (13% объема; Вектор, Россия), рН 3.2. Уровень дофамина и его метаболитов выражали в нг/мг белка, измеренного по Брэдфорду.

*Экспрессию генов* определяли при помощи количественного метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), разработанного в нашей лаборатории [23]. Использовали два типа стандартов: внешний и внутренний. Внутренний стандарт (мРНК rPol II) применяли для контроля обратной транскрипции в качестве основы для расчета уровня мРНК исследуемых генов. В предварительных опытах различий в уровне мРНК rPol II в исследуемых структурах мозга не выявили. Внешним стандартом служила ДНК мыши с известной концентрацией, что позволяет контролировать ПЦР и определять число копий мРНК исследуемых генов и rPol II в образцах.

*Выделение общей РНК.* РНК выделяли, используя TRIzol Reagent (Lifetechnologies, США) в соответствии с инструкцией производителя. РНК разводили водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранили при –70 °С. Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [23].

*Реакция обратной транскрипции.* Общую РНК (8 мкл, или 1 мкг) смешивали со статистическим праймером (длина — 6 нуклеотидов, 180 нг, конечная концентрация праймера 5 мкМ) и стерильным раствором KCl (2.25 мкмоль в объеме 16 мкл), денатурировали при 94 °С в течение 5 мин на амплификаторе БИС М-120 (БИС-Н, Россия), после чего проводили отжиг при 41 °С в течение 15 мин. Затем добавляли 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу М-MLV (200 ед.), Tris-HCl (рН 8.3, 0.225 мкмоль), смесь dNTP (0.015 мкмоль каждого), DTT (0.225 мкмоль) и  $\text{MnCl}_2$  (0.03 мкмоль). Полу-

## Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	T <sub>отж.</sub> °C	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>Drd1</i>	F 5'-ggaaacctgtgcaatgetctc-3' R 5'-ccagccaaccasacaatacatcg-3'	64	222
<i>Drd2</i>	F 5'-tccgccactcttgacatacattg-3' R 5'-cccatccacagcctctctaag-3'	65	203
<i>rPol II</i>	F 5'-tgtgacaactccatacaatgc-3' R 5'-ctctcttagtgaattgcgtact-3'	60	194

ченную смесь (конечный объем 31 мкл) инкубировали при 41 °C в течение 60 мин. Синтезированную кДНК хранили при температуре –20 °C.

*Полимеразная цепная реакция в реальном времени (real-time PCR)*. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (см. таблицу), разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании Биосан (Россия). 1 мкл кДНК смешивали с ПЦР-буфером (2.5 мкл содержит интеркалирующий краситель SYBR green I), а также с 2.5 мМ dNTP (2.5 мкл), 25 мМ MgCl<sub>2</sub> (2.5 мкл), смесью праймеров (по 2.5 мкл прямого и обратного), Taq-ДНК-полимеразой (0.2 мкл) и стерильной водой до конечного объема 20 мкл. При приготовлении реакционной смеси использовали наборы реагентов «Синтол» (Россия). ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 480 System (Roche, Швейцария) по следующему протоколу: 3 мин 94 °C, 1 цикл; 10 с при 94 °C, 30 с при соответствующей температуре отжига (см. таблицу); 30 с при 72 °C, 40 циклов. Серию разведений геномной ДНК с концентрацией 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл амплифицировали одновременно в отдельных пробирках и использовали как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочную кривую в координатах «Ст (значение порогового цикла) — log P (десятичный логарифм количества стандарта ДНК)» строили автоматически, используя программное обеспечение LightCycler 480 System. Уровень экспрессии генов представляли как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК rPol I, выполняющей функцию внутреннего стандарта.

Все данные представляли как средние ± ошибка среднего и анализировали с помощью однофакторного ANOVA.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В тесте «открытое поле» не было выявлено различий по длине пройденного пути между мышами исследуемых линий ( $F_{1,13} < 1$ ,  $p > 0.05$ ) (рис. 1, А). В то же время мыши TNF KO проводили больше времени в центре арены открытого поля ( $F_{1,13} = 5.7$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 1, Б) и демонстрировали более высокий уровень вертикальных стоек ( $F_{1,13} = 14.3$ ,  $p < 0.01$ ) (рис. 1, В) по сравнению с диким типом.

Уровни дофамина, ДОФУК и ГВК не различались между исследуемыми линиями во фронтальной коре ( $F_{1,13} < 1$ ,  $p > 0.05$  для всех веществ) (рис. 2, А) и стриатуме ( $F_{1,13} < 1$ ,  $p > 0.05$  для всех веществ) (рис. 2, Б). Уровни дофамина ( $F_{1,13} = 15.6$ ,  $p < 0.01$ ) и ДОФУК ( $F_{1,13} = 4.7$ ,  $p < 0.05$ ) были существенно ниже в черной субстанции у мышей TNF KO по сравнению с диким типом, в то же

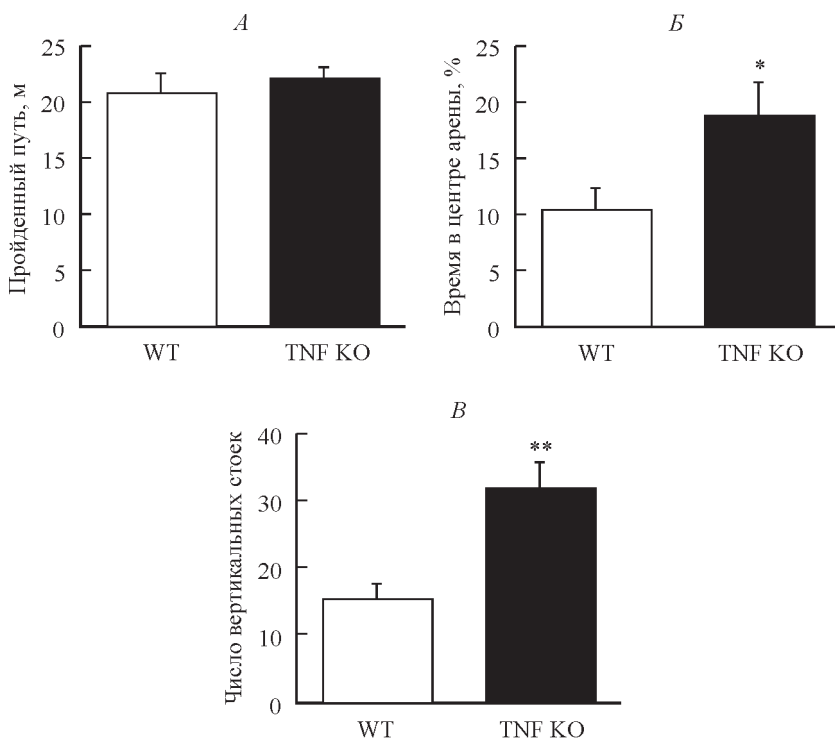


Рис. 1. Длина пройденного пути (А), время, проведенное в центре arenas (Б), число вертикальных стоек (В) в тесте «открытое поле» у самцов дикого типа (WT, линия C57Bl/6) и нокаутов гена фактора некроза опухоли (TNF KO).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  по сравнению с диким типом. Число животных в группе составляет 7–8 мышей.

время по уровню ГVK в данной структуре линии не различались ( $F_{1.13} = 1.4$ ,  $p > 0.05$ ) (рис. 2, В). Индексы катаболизма дофамина (ДОФУК/дофамин) не различались у исследуемых линий для фронтальной коры ( $F_{1.13} < 1$ ,  $p > 0.05$ ) и стриатума ( $F_{1.13} < 1$ ,  $p > 0.05$ ). Однако для черной субстанции отношение ДОФУК/дофамин было выше у нокаутной линии по сравнению с диким типом на уровне тенденции ( $F_{1.13} = 3.9$ ,  $p = 0.069$ ) (рис. 3, А). Индексы катаболизма дофамина (ГVK/дофамин) не различались у исследуемых линий для фронтальной коры ( $F_{1.13} < 1$ ,  $p > 0.05$ ) и стриатума ( $F_{1.13} < 1$ ,  $p > 0.05$ ). В то же время отношение ГVK/дофамин было достоверно выше у мышей TNF KO по сравнению с диким типом для черной субстанции ( $F_{1.13} = 11.7$ ,  $p < 0.01$ ) (рис. 3, Б).

Исследуемые линии не отличались по уровню мРНК гена *Drd1*, кодирующего дофаминовый D1-рецептор, ни в коре ( $F_{1.13} = 1.2$ ,  $p > 0.05$ ), ни в стриатуме ( $F_{1.13} < 1$ ,  $p > 0.05$ ), ни в черной субстанции ( $F_{1.13} < 1$ ,  $p > 0.05$ ). В то же время уровень экспрессии гена *Drd1* в гиппокампе был ниже у нокаутов по сравнению с диким типом ( $F_{1.13} = 4.7$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 4, А). Также данные линии не отличались по уровню мРНК гена *Drd2*, кодирующего дофаминовый D2-рецептор, ни в коре ( $F_{1.13} = 3.7$ ,  $p > 0.05$ ), ни в гиппокампе ( $F_{1.13} < 1$ ,  $p > 0.05$ ), ни в стриатуме ( $F_{1.13} < 1$ ,  $p > 0.05$ ). В то же время мыши TNF KO демонстрировали более высокий уровень экспрессии гена *Drd2* в черной субстанции по сравнению с диким типом ( $F_{1.13} = 13.1$ ,  $p < 0.01$ ) (рис. 4, Б).

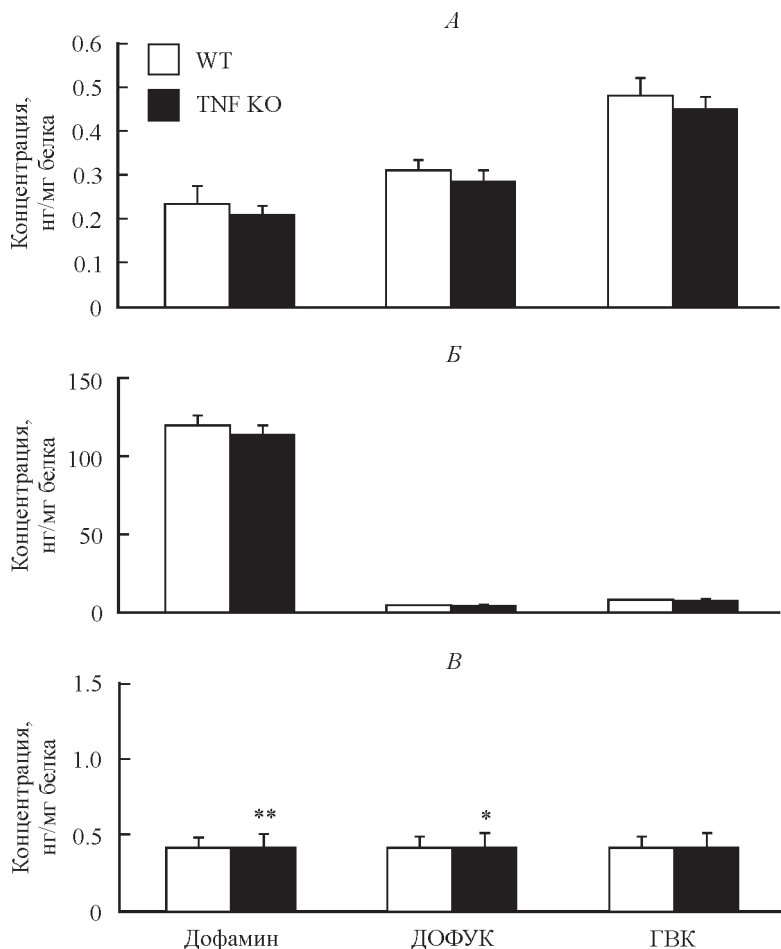


Рис. 2. Уровень дофамина и его метаболитов во фронтальной коре (А), стриатуме (Б) и черной субстанции (В) у самцов дикого типа (WT, линия С57В1/6) и нокаутов гена фактора некроза опухоли (TNF KO).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  по сравнению с диким типом. Число животных в группе составляет 7—8 мышей.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью настоящего исследования было изучение влияния нокаута гена *Tnf* на двигательную активность, тревожность и состояние дофаминовой системы мозга у мышей. В тесте «открытое поле», который является наиболее широко используемым тестом для исследования параметров двигательной активности и тревожности, мыши линии TNF KO не отличались по длине пройденного пути от дикого типа, но проводили больше времени в центре арены и демонстрировали более высокий уровень вертикальных стоек, что говорит о сниженном уровне тревожности у этих животных. Имеющиеся данные литературы по влиянию нокаута гена *Tnf* на двигательную активность и тревожное поведение у мышей немногочисленны и достаточно противоречивы, их сравнение несколько затруднительно, поскольку они получены с использованием

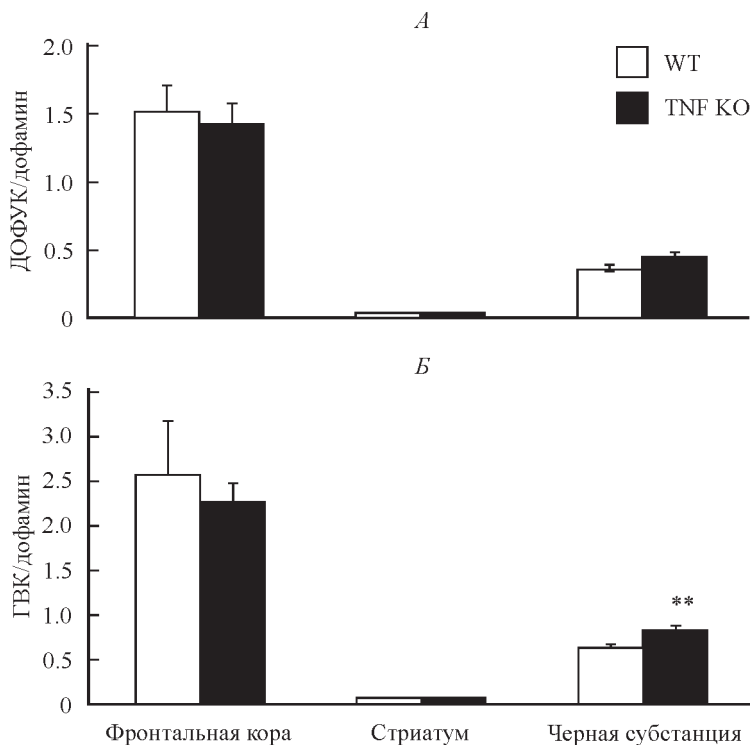


Рис. 3. Индексы катаболизма дофамина ДОФУК/дофамин (А) и ГВК/дофамин (Б) для фронтальной коры, стриатума и черной субстанции у самцов дикого типа (WT, линия C57Bl/6) и нокаутов гена фактора некроза опухоли (TNF KO).

\*\*  $p < 0.01$  по сравнению с диким типом. Число животных в группе составляет 7—8 мышей.

различных методик и на нокаутных животных, различающихся возрастом и способом инактивации гена *Tnf*.

Так, Н. Golan и соавт. [17] показали, что в тесте «открытое поле» отношение «время на периферии арены/время в центре» выше у мышей TNF KO, при этом нокаут не влиял на число вертикальных стоек в этом тесте и на время, проведенное в закрытых рукавах в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (другой тест на тревожное поведение). Однако в данной работе не указан точный возраст животных, а время тестирования составило всего 2 мин, тогда как в нашем эксперименте этот параметр по общепринятому стандарту был равен 5 мин. В другой работе К. Yamada и соавт. [37] показали у мышей с нокаутом гена *Tnf* снижение двигательной (горизонтальной) активности в тесте «открытое поле» и времени, проведенного в открытых рукавах в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» по сравнению с диким типом, что говорит об увеличении тревожности у нокаутов, и также в данной работе не указан возраст мышей.

Изучение влияния нокаута гена *Tnf* на поведение мышей разного возраста провели М. L. Samara и соавт. [9, 10]. Однако следует отметить, что данными авторами при тестировании мышей в «открытом поле» был использован только параметр «пройденный путь» в качестве меры двигательной активности и не была приведена информация о времени, проведенном в центре арены, и о числе вертикальных стоек. Двигательная активность нокаутов не отличалась ни в возрасте 3, ни в возрасте 6 месяцев от дикого типа. Авторы оценивали



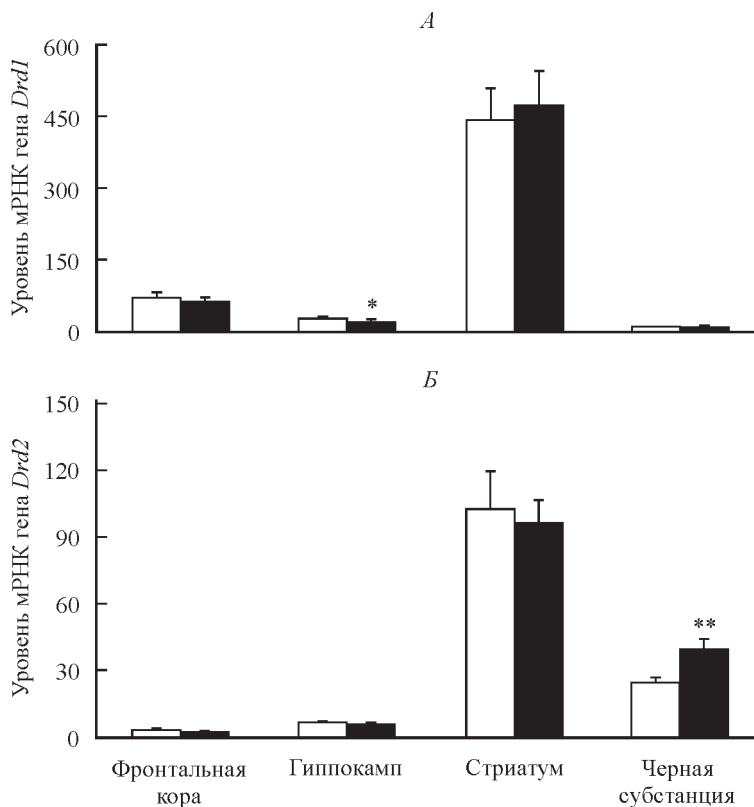


Рис. 4. Уровень мРНК генов *Drd1* (А) и *Drd2* (Б), кодирующих дофаминовые D1- и D2-рецепторы, в структурах мозга у самцов дикого типа (WT) и нокаутов гена фактора некроза опухоли (TNF KO).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  по сравнению с диким типом. Число животных в группе составляет 7–8 мышей.

тревожность в тесте «приподнятый О-образный лабиринт»: в возрасте 3 месяцев уровень тревожности у нокаутов был ниже, чем у мышей дикого типа, но к возрасту 6 месяцев это различие пропадало [9, 10]. Эти данные совпадают с нашими результатами, демонстрирующими сниженную тревожность у нокаутов гена *Tnf* по сравнению с диким типом на фоне отсутствия различий по двигательной активности. Примечательно также, что наши результаты согласуются с фармакологическими данными, демонстрирующими у грызунов анксиогенный эффект центрального введения TNF [12] и анксиолитическое действие хронического ингибирования TNF [3].

Нейромедиатор дофамин участвует в регуляции многих видов поведения в норме и патологии, в том числе тревожного поведения [7, 18, 38]. Основными дофаминовыми путями являются мезокортикальный и мезолимбический, участвующие в регуляции эмоциональных реакций, а также nigrostriарный путь, главным образом контролирующей двигательную активность [4].

Известно, что гиппокамп является основной частью мезолимбической системы и активно вовлечен в модуляцию страха и тревожного поведения [38]. В данной работе было показано, что снижение тревожности у нокаутов гена *Tnf* сопровождается уменьшением уровня мРНК гена D1-рецептора в гиппокампе по сравнению с диким типом. Этот результат согласуется с данными литературы, показывающими, что введение антагонистов

D1-рецепторов в гиппокамп оказывает анксиолитический эффект у мышей [31, 32].

В настоящей работе было показано, что нокаут гена *Tnf* приводит к увеличению уровня экспрессии гена D2-рецептора и к снижению уровня дофамина в черной субстанции. В данной структуре D2-рецепторы выступают в роли соматодендритных ауторецепторов, ингибируя синтез дофамина и возбудимость дофаминовых нейронов и тем самым осуществляя регуляцию функциональной активности дофаминовой системы по принципу обратной связи [2, 16]. Таким образом, снижение уровня дофамина в черной субстанции, по-видимому, является следствием повышенной чувствительности D2-ауторецепторов в этой структуре мозга. Следует отметить, что исследование влияния нокаута гена *Tnf* на экспрессию генов, кодирующих D1- и D2-рецепторы, было впервые проведено в данной работе. Ранее было показано отсутствие эффекта нокаута гена *Tnf* на уровне дофамина и его метаболитов в коре, стриатуме, таламусе/гипоталамусе, продолговатом мозге у мышей, однако черная субстанция в данной работе не была изучена [37]. Наши результаты совпадают с этими данными, а также дополняют их.

Примечательно, что трансгенные мыши со сверхэкспрессией TNF демонстрировали снижение активности тирозингидроксилазы (ключевого фермента синтеза дофамина) в стриатуме [1]. Этот факт, а также полученные нами данные позволяют предположить, что дисбаланс в экспрессии TNF критически влияет на развитие дофаминергической системы мозга. Это предположение подкрепляется исследованиями *in vitro* на культурах клеток, демонстрирующих влияние TNF на дифференциацию дофаминергических нейронов [14].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об участии TNF в регуляции тревожного поведения и функциональной активности дофаминовой системы мозга. Созданная российскими учеными новая линия с нокаутом гена *Tnf* является адекватной и перспективной моделью для изучения влияния дефицита TNF на поведение и функции ЦНС в норме и патологии.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 15-04-08254 и бюджетным проектом № 0324-2018-0016.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Aloe L., Fiore M. TNF-alpha expressed in the brain of transgenic mice lowers central tyroxine hydroxylase immunoreactivity and alters grooming behavior. *Neurosci. Lett.* 238: 65—68. 1997.
- [2] Anzalone A., Lizardi-Ortiz J. E., Ramos M., De Mei C., Hopf F. W., Iaccarino C., Halbout B., Jacobsen J., Kinoshita C., Welter M., Caron M. G., Bonci A., Sulzer D., Borrelli E. Dual control of dopamine synthesis and release by presynaptic and postsynaptic dopamine D2-receptors. *J. Neurosci.* 32(26): 9023—9034. 2012.
- [3] Bayramgürler D., Karson A., Ozer C., Utkan T. Effects of long-term etanercept treatment on anxiety- and depression-like neurobehaviors in rats. *Physiol. Behav.* 119: 145—148. 2013.
- [4] Beaulieu J. M., Gainetdinov R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 63(1): 182—217. 2011.
- [5] 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.* 465(3): 417—430. 2003.
- [6] Biesmans S., Bouwknegt J. A., Donck L. Ver., Langlois X., Acton P. D., Haes P. De, Davoodi N., Meert T. F., Hellings N., Nuydens R. Peripheral administration of tumor necrosis factor-alpha induces neuroinflammation and sickness but not depressive-like behavior in mice. *Biomed. Res. Int.* 2015: 716920. 2015.

- [7] *Bonomaully M., Khong T., Fotriadou M., Tully J.* Anxiety and depression related to elevated dopamine in a patient with multiple mediastinal paragangliomas. *Gen. Hosp. Psychiatry.* 36(4): 7—8. 2014.
- [8] *Bradley J. R.* TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 214: 149—160. 2008.
- [9] *Camara M. L., 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.* 290: 51—60. 2015.
- [10] *Camara M. L., 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.* 38(12): 3102—3114. 2013.
- [11] *Capuron L., Miller A. H.* Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol. Ther.* 130(2): 226—238. 2011.
- [12] *Connor T. J., Song C., Leonard B. E., Merali Z., Anisman H.* An assessment of the effects of central interleukin-1beta, -2, -6, and tumor necrosis factor-alpha administration on some behavioural, neurochemical, endocrine and immune parameters in the rat. *Neuroscience.* 84(3): 923—933. 1998.
- [13] *De Lella Ezcurra A. L., Chertoff M., Ferrari C., Graciarena M., Pitossi F.* Chronic expression of low levels of tumor necrosis factor-alpha in the substantia nigra elicits progressive neurodegeneration, delayed motor symptoms and microglia/macrophage activation. *Neurobiol. Dis.* 37(3): 630—640. 2010.
- [14] *Doherty G. H.* Developmental switch in the effects of TNFalpha on ventral midbrain dopaminergic neurons. *Neurosci. Res.* 57(2): 296—305. 2007.
- [15] *Dowlati Y., Herrmann N., Swardfager W., Liu H., Sham L., Reim E. K., Lanctôt K. L.* A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol. Psychiatry.* 67(5): 446—457. 2010.
- [16] *Ford C. P.* The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience.* 282: 13—22. 2014.
- [17] *Golan H., Levav T., Mendelsohn A., Huleihel M.* Involvement of tumor necrosis factor alpha in hippocampal development and function. *Cereb. Cortex.* 14(1): 97—105. 2004.
- [18] *Grace A. A.* Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nat. Rev. Neurosci.* 17(8): 524—532. 2016.
- [19] *Harms A. S., Barnum C. J., Ruhn K. A., Varghese S., Treviño I., Blesch A., Tansey M. G.* Delayed dominant-negative TNF gene therapy halts progressive loss of nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Mol. Ther.* 19(1): 46—52. 2011.
- [20] *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.* 62(1): 419—426. 2012.
- [21] *Klintworth H., Garden G., Xia Z.* Rotenone and paraquat do not directly activate microglia or induce inflammatory cytokine release. *Neurosci. Lett.* 462(1): 1—5. 2009.
- [22] *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.* 186(9): 1585—1590. 1997.
- [23] *Kulikov A. V., Naumenko V. S., Voronova I. P., Tikhonova M. A., Popova N. K.* Quantitative RT-PCR assay of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard. *J. Neurosci. Methods.* 141: 97—101. 2005.
- [24] *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.* 170(2): 345—351. 2008.
- [25] *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.* 35(5): 1592—1600. 2005.
- [26] *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.* 73(1): 309—321. 1999.
- [27] *Marino M. W., Dunn A., Grail D., Inglesse 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. USA.* 94(15): 8093—8098. 1997.
- [28] *McAfoose J., Koerner H., Baune B. T.* The effects of TNF deficiency on age-related cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology.* 34(4): 615—619. 2009.

- [29] McCoy M. K., Martinez T. N., Ruhn K. A., Szymkowski D. E., Smith C. G., Botterman B. R., Tansey K. E., Tansey M. G. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 26(37): 9365—9375. 2006.
- [30] 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.* 165(1—2): 208—210. 1994.
- [31] Nasehi M., Kafi F., Zarrindast M. R. Differential mechanisms of opioidergic and dopaminergic systems of the ventral hippocampus (CA3) in anxiolytic-like behaviors induced by cholestasis in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 714(1—3):352—358. 2013.
- [32] Nasehi M., Mafi F., Oryan S., Nasri S., Zarrindast M. R. The effects of dopaminergic drugs in the dorsal hippocampus of mice in the nicotine-induced anxiogenic-like response. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 98(3): 468—473. 2011.
- [33] 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.* 37: 257—263. 2002.
- [34] 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.* 184(4): 1397—1411. 1996.
- [35] Sarkar C., Basu B., Chakroborty D., Dasgupta P. S., Basu S. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain Behav. Immun.* 24(4): 525—528. 2010.
- [36] Villalba R. M., Smith Y. Differential striatal spine pathology in Parkinson's disease and cocaine addiction: a key role of dopamine? *Neuroscience.* 251: 2—20. 2013.
- [37] 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.* 111: 131—138. 2000.
- [38] Zarrindast M. R., Khakpai F. The modulatory role of dopamine in anxiety-like Behavior. *Arch. Iran Med.* 18(9): 591—603. 2015.

Поступила 6 III 2018