

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ / В.А. Кратасюк/

« ____ » _____ 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Влияние альфа-интерферона на развитие депрессии у крыс при пятикратном
воздействии

Научный руководитель	_____	д.б.н	<u>О.Л. Лопатина</u>
	подпись, дата	ученая степень	инициалы, фамилия
Научный консультант	_____	д.м.н	<u>Н.А. Малиновская</u>
	подпись, дата	ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник ББ16-31 Б	_____		<u>О.А. Ушакова</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Выпускная квалифицированная работа на тему «Влияние альфа-интерферона на развитие депрессии у крыс при пятикратном воздействии» содержит 54 страницы текстового документа, 38 использованных источников, 14 рисунков, 7 приложений.

Ключевые слова: α -ИНТЕРФЕРОН, ДЕПРЕССИЯ, МОДЕЛЬ ОСТРОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА, ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ТЕСТЫ, ИММУНОГИСТОХИМИЯ, ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ.

Объект исследования – половозрелые самки крыс линии Wistar.

Цель исследования – оценка пятикратного воздействия альфа интерферона на интегративные функции головного мозга и изменение экспрессии рецепторов к интерферону у крыс с выработанной моделью острого стресса и без нее.

Задачи исследования:

1. Оценить выраженность неврологического дефицита и принятия новой пищи (тест на гипонеофагию) у крыс в физиологических условиях и при модели депрессии после введения интерферона;
2. Оценить стрессогенность крыс в физиологических условиях и с моделью депрессии до и после введения интерферона с помощью тестов «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт»;
3. Выяснить, какие эффекты оказывал интерферон на поведение животных с моделью депрессии и в контроле;
4. Выявить особенности изменения процента клеток, экспрессирующих рецепторы к альфа- и гамма-интерферону в различных областях головного мозга крыс с моделированной депрессией после его введения.

Результаты исследования показали, что α -ИФН, в основном, оказывает нейротоксический эффект в контроле, а у животных, перенесших острый стресс, его стрессогенный эффект менее выражен.

Анализ относительного числа клеток, экспрессирующих рецепторы к интерферону, выявил усиление экспрессии к рецепторам α -ИФН практически у всех экспериментальных групп в энторинальной коре и снижение в гиппокампе и базолатеральной миндалине. Экспрессия к рецепторам γ -ИФН у групп, перенесших стресс, снижалась во всех участках головного мозга крыс.

Указанные эффекты на развитие депрессия-подобного состояния в будущем можно будет использовать при создании новых вариантов моделей экспериментальной депрессии.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 Обзор литературы	7
1.1 Интерфероны	7
1.2 Медицинская значимость биологических эффектов α -интерферона	8
1.3 Влияние α -ИФН на развитие депрессии	9
1.4 Иммуитет и нервная система	11
1.5 Интерферон-продуцирующие клетки ЦНС	12
1.6 Клетки ЦНС, воспринимающие ИФН.....	12
1.7 Депрессия и нейропластические изменения	12
1.8 Области мозга, подверженные изменениям при депрессии	14
1.9 Депрессия у крыс.....	15
2 Материалы и методы	17
2.1 Объект исследования и дизайн эксперимента.....	17
2.2 Применяемые растворы	17
2.3 Проводимые тестирования	18
2.3.1 Неврологическая шкала NSS (Neurological Score System)	18
2.3.2 Тест на гипонеофагию (ТГНФ)	18
2.3.3 Тест «открытое поле»	19
2.3.4 Приподнятый крестообразный лабиринт	20
2.4 Работа с биологическим материалом	21
2.4.1 Подготовка материала, приготовление срезов	21
2.4.2 Иммуногистохимия	22
2.4.3 Флуоресцентная микроскопия.....	22
2.5 Анализ данных.....	23
3 Результаты и обсуждение.....	24
3.1 Результаты тестирований	24
3.1.1 NSS-тест.....	24
3.1.2 Гипонеофагия	25
.....	26
3.1.3 Тест «Открытое поле»	26
3.1.4 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»	30

3.2 Результаты иммуногистохимии	33
3.2.1 Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к α -ИФ	33
3.2.2 Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к γ -ИФ	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	40
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	42
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	43
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Дизайн эксперимента	48
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Создание модели острого иммобилизационного стресса....	49
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Протокол теста для оценки неврологического дефицита (NSS-тест).....	50
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Примеры нормального и депрессия-подобного поведения в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт»	51
ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Протокол проведения иммуногистоцитохимии для «свободно-плавающих» срезов.....	52
ПРИЛОЖЕНИЕ Е. Фотографии флуоресцентной микроскопии рецепторов к интерферонам	53
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж. Интерпретация диаграмм «ящик с усами».....	54

ВВЕДЕНИЕ

Препараты на основе интерферонов (ИФН) в настоящее время широко используются для лечения вирусных заболеваний, обладают иммуномодулирующей активностью, а также оказывают антипролиферативное действие на опухолевые клетки. Однако было замечено, что они могут оказывать негативное влияние на функциональность органов или систем органов. В частности, со стороны центральной нервной системы (ЦНС), α -ИФН индуцирует развитие депрессивных состояний у пациентов, что ограничивает его применение в качестве противовирусного и противоопухолевого препарата. Тем не менее, молекулярные механизмы, лежащие в основе ИФН-индуцированной депрессии до конца не изучены [1]. Используя имеющиеся литературные данные, в сочетании с комплексным набором поведенческих тестов, и анализом изменения экспрессии к интерферонам в различных областях головного мозга, мы бы хотели лучше понять невропатологию, лежащую в основе депрессии, вызванной α -ИФН, разработать новые стратегии профилактики и лечения депрессивных эффектов, вызванных α -ИФН.

Цель данной работы – оценка 5-кратного воздействия альфа интерферона на интегративные функции головного мозга и изменение экспрессии рецепторов к интерферону у крыс с выработанной моделью острого стресса и без нее.

Задачи исследования:

1. Оценить выраженность неврологического дефицита и принятия новой пищи (тест на гипонеофагию) у крыс в физиологических условиях и при модели депрессии после введения интерферона;
2. Оценить стрессогенность крыс в физиологических условиях и с моделью депрессии до и после введения интерферона с помощью тестов «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт»;
3. Выяснить, какие эффекты оказывал интерферон на поведение животных с моделью депрессии и в контроле;

4. Выявить особенности изменения процента клеток, экспрессирующих рецепторы к альфа- и гамма-интерферону в различных областях головного мозга крыс с моделированной депрессией после его введения.

1 Обзор литературы

1.1 Интерфероны

Интерфероны – ряд цитокинов, обладающих сходными свойствами и выделяемых клетками организма в ответ на вторжение вируса. «Определяемый в качестве интерферона фактор должен быть белковой природы, обладать антивирусной активностью по отношению к разным вирусам, по крайней мере, в гомологичных клетках, опосредованной клеточными метаболическими процессами, включающими синтез РНК и белка» [2].

Для классификации ИФН рекомендована система международной номенклатуры, основанная на различиях антигенных, биологических и физико-химических свойств. Существуют естественные ИФН, полученные из лейкоцитов и лимфоцитов донорской крови, и рекомбинантные, полученные генно-инженерным способом. Отличительной особенностью рекомбинантных ИФН является то, что они продуцируются вне организма человека бактериальными штаммами (*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, дрожжи), в генетический материал которых встроены гены человеческого ИФН [3].

Выделяют ИФН трех типов: Тип I объединяет 17 подтипов, включая 13 подтипов α -ИФН, наряду с β -ИФН, ϵ -ИФН, κ -ИФН и ω -ИФН. ИФН типа I имеют широкий спектр биологических функций, включая модуляцию врожденных и адаптивных иммунных реакций, антипролиферативные функции и, что наиболее важно, противовирусную активность. Примечательно, что, хотя все подтипы ИФН типа I имеют ограниченное структурное сходство, все они имеют один и тот же гетеродимерный рецепторный комплекс, состоящий из одной цепи рецептора $\alpha 1$ -ИФН (IFNAR1) и одной цепи рецептора $\alpha 2$ -ИФН (IFNAR2) [4].

II тип представлен γ -ИФН. Он играет важную роль в распознавании и устранении патогенов. γ -ИФН, являясь центральным эффектором клеточного иммунитета, может координировать множество антимикробных функций. Он может служить для усиления выработки антигена через антигенпрезентирующие клетки путем усиления распознавания антигена посредством родственного взаимодействия с Т-клетками, увеличения продукции активных форм кислорода

и промежуточных звеньев активного азота и индукции противовирусных реакций. Кроме того, раковые клетки разрушаются под действием γ -ИФН посредством индукции антипролиферативного состояния [5].

ИФН типа III - это самое последнее обнаруженное семейство, включающее λ 1-ИФН (ИЛ-29), λ 2-ИФН (ИЛ-28a), λ 3-ИФН (ИЛ-28b) и λ 4-ИФН, который напоминает λ 3-ИФН. Данный тип был идентифицирован как новый класс цитокинов, с иммунными и биологическими функциями, перекрывающимися с ИФН типа I, но при этом они более специализированные и экспрессируются в основном в эпителиальных клетках [6].

1.2 Медицинская значимость биологических эффектов α -интерферона

α -ИФН представляет собой плейотропный цитокин, по степени изученности и масштабам применения занимающий «лидирующее» положение среди используемых в клинической практике цитокинов.

Препараты на его основе широко используются при лечении вирусов, инициируя воспалительный ответ с высвобождением цитокинов (ИЛ-12, α -ИФН, ФНО- α и ИЛ-6) и продукцией оксида азота (NO) стимулирующего NO-зависимую бактерицидность. Препараты помогают в защите от некоторых бактерий, простейших, грибов и гельминтов. Обладают выраженным иммуномодулирующим действием, индуцируя экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС I класса) и активируя выработку естественных киллеров (NK-клеток) и регулируют их активность, ингибируя экспрессию ИЛ-12, позитивно и негативно контролируют экспрессию γ -ИФН и способствуют созреванию и активации дендритных клеток. Оказывают антипролиферативное действие за счёт способности тормозить размножение нормальных и некоторых типов опухолевых клеток путём ингибирования пролиферации злокачественных клеток и усиление противоопухолевых иммунных реакций. Обладают антиангиогенной активностью, выступая антагонистом ангиогенных цитокинов, фактора роста фибробластов и ИЛ-8, за

счёт чего подавляется рост ряда опухолей (особенно выраженный для меланомы) и процессов метастазирования [7].

1.3 Влияние α -ИФН на развитие депрессии

Лечение препаратами α -ИФН вызывает нарушения концентрации, памяти, движения и настроения почти у половины всех пациентов. По этой причине его всё чаще заменяют более специфическими лекарственными средствами. Изучение α -ИФН за последнее десятилетие предоставило ценную информацию о патогенезе большой депрессии, особенно в условиях, связанных с нейровоспалением. α -ИФН нарушает нейротрофическую передачу сигналов и препятствует разрастанию нейритов, способствует синаптической пластичности, эндогенному нейрогенезу и нейрональному выживанию. Реакции мозга при α -ИФН индуцированной депрессии напоминают идиопатическую депрессию, что подтверждается наличием общих генетических сигнатур, среди которых следует отметить ряд генов выживания и пластичности нейронов [8].

Механизмы, лежащие в основе этого процесса, остаются неясными, но некоторые гипотезы предполагают, что депрессия, вызванная α -ИФН, может быть связана с влиянием α -ИФН на метаболизм триптофана, синтез 5-гидрокситриптамина и активность рецепторов обратного захвата серотонина. Сообщается, что α -ИФН вызывает депрессию с помощью повышающей регуляции оси гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), изменения нейротрансмиссии моноаминов и индукции провоспалительных цитокинов. Согласно некоторым данным, α -ИФН может напрямую взаимодействовать с опиоидными рецепторами, которые также участвуют в индукции депрессивного поведения [9].

В ходе ИФН-терапии при лечении гепатита С было выявлено снижение уровней триптофана (ТРП) и серотонина в плазме, а также повышение уровня кинуренина (КИН) в плазме и спинномозговой жидкости. Вместе с тем, у пациентов увеличивается отношение КИН/ТРП, свидетельствующее об активности индоламина 2,3-диоксигеназы (ИДО) – фермента, который катализирует превращение ТРП в КИН. В свою очередь, КИН и его метаболиты

играют важную роль в патогенезе депрессивных расстройств [10]. В физиологических условиях метаболизм триптофана идёт главным образом в печени, с участием фермента триптофан-2,3-диоксигеназы, через образование кинуренинов. В результате воспалительных реакций организма, с помощью противовоспалительных цитокинов (ИЛ-1 и ИЛ-6) повышается экспрессия ИДО и стимулируется катаболизм ТРП [8]. При этом повышается содержание хинолиевой кислоты (ХК), уровень которой коррелирует с тяжестью симптомов депрессии. ХК проявляет агонистическую активность по отношению к никотинамидным рецепторам и в высоких концентрациях может способствовать активации протеаз и генерации активных форм кислорода и азота, таких как супероксидный радикал (O^{2-}) и оксид азота (NO), что может привести к гибели нервных клеток [11] и избыточному высвобождению глутаминовой кислоты, которая может вызывать повреждение нейронов и связанные с ними поведенческие изменения [10]. В случае воспалительных реакций, активирующих ИДО, наблюдается снижение доступности серотонина для серотонинергической нейротрансмиссии, в результате чего происходит патогенетическая индукция депрессивных расстройств [11].

Кроме того, высвобождается кортикотропин-рилизинг-гормон (КРГ) в гипоталамусе с последующей активацией оси ГГНС. Длительное воздействие повышенных концентраций КРГ приводит к формированию депрессивного состояния, бессонницы, хронической тревоги, истощению и понижению либидо [12].

Преыдушие исследования показали, что различные цитокины, включая интерлейкин-1-бета (ИЛ-1 β), ИЛ-6 и ФНО- α , как известно, активируются как на периферии, так и в головном мозге пациентов с крупными депрессивными расстройствами, увеличивая проницаемость гематоэнцефалического барьера и, в конечном счете, вызывая изменения в отдельных областях мозга, включая гиппокамп [13].

1.4 Иммуитет и нервная система

Исследования влияния ЦНС на иммунную систему в основном сосредоточены на воздействии стресса на иммунную систему, однако исследования подтверждают, что иммунная система, в свою очередь, тоже может влиять на ЦНС, и, следовательно, существует цепь между этими двумя системами. Регуляторные молекулы или цитокины, полученные из активированных иммунных клеток, вызывают ответ ЦНС, который, в свою очередь, влияет на иммунную систему. Взаимодействия, которые происходят в мозге, особенно на уровне гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, в ответ на стрессы аналогичны тем, которые возникают в ответ на внутренние события иммунной системы [14]. Так, в желудочках, субарахноидальном пространстве и рядом с сосудами, дендритные клетки и макрофаги способствуют иммунному ответу, но более ограниченному, нежели в периферических тканях [15].

Симпатоадреналовая и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая системы в совокупности формируют ответную реакцию организма на стресс, посредством выработки основных гормонов стресса – адреналина, норадреналина и кортизола, взаимодействующих с рецепторами нервных, эндокринных и иммунных клеток. Уже в первые минуты воздействия острого стресса лейкоциты активируются гормонами и выходят в кровоток, распределяясь по всему организму, избирательно накапливаясь в тканях, наиболее подверженных стрессу и стимулируют иммунные реакции. При непродолжительном стрессе иммунный ответ активируется, но в случае продолжительного воздействия формируется хронический стресс и тормозит иммунный ответ вследствие изменения секреции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Это приводит к развитию болезненных состояний в организме, приводящих к образованию соматических патологий [16].

1.5 Интерферон-продуцирующие клетки ЦНС

Основными клетками в ЦНС, продуцирующими интерферон в ответ на вирусные инфекции, являются плазмочитоидные дендритные клетки (ПДК). Выделяемый ими интерферон инициирует иммунный отклик организма. В физиологических условиях ЦНС не содержит ПДК, поэтому микроглиальные клетки и периваскулярные дендритные клетки в таком случае инициируют иммунные реакции [17].

При патологических нарушениях мозга, болезни Альцгеймера или рассеянном склерозе α - и β -ИФН продуцируются микроглиальными клетками и/или макрофагами [18].

1.6 Клетки ЦНС, воспринимающие ИФН

В ЦНС все типы клеток чувствительны к ИФН I типа. По результатам исследований, за счет усиления экспрессии интерферон-стимулирующих генов, осуществляется противовирусная защита вследствие трансляции белков, ингибирующих вирусную репликацию (PKR, ADAR-1, Mx и т.д.), а также генов, кодирующих компоненты убиквитин-протеасомного пути деградации белков, осуществляющих деградацию вирусных белков, обработку пептидов и антиген-презентирующую функцию [19].

1.7 Депрессия и нейропластические изменения

Депрессия – одно из самых распространенных психических заболеваний нашего времени. Факторы, приводящие к развитию депрессии – стресс, воспаление и эндогенная интоксикация организма. В результате повышается функциональная активность глутаматных НМДА-рецепторов в мембранах клеток лимбических структур головного мозга, что приводит к развитию так называемой «глутаматной эксайтотоксичности» - при чрезмерном возбуждении глутаматергической реакции происходит нарушение передачи сигналов в мозге и вторичный дефицит активности этих систем мозга. Кроме того, нарушается нейропластичность и синаптическая пластичность лимбических структур мозга. Вследствие накопления Ca^{2+} в цитоплазме нейронов при активации внесинаптических НМДА-рецепторов и активации нейрональной синтазы

оксида азота вызываются дегенеративные и атрофические повреждения нейронов, что приводит к нарушению когнитивных, эмоциональных и мотивационных реакций головного мозга [20].

Депрессивные состояния приводят в головном мозге к целому ряду изменений, связанных с их клиническим проявлением. В первую очередь, нарушается метаболизм биогенных аминов, которые образуются при декарбоксилировании аминокислот и осуществляют химическую передачу нервных импульсов. Во-вторых, уменьшается число дендритов, обеспечивающих связь между клетками головного мозга и специализированными образованиями; далее возникают дегенерация и апоптоз нейронов вследствие чрезмерной продукции возбуждающих нейромедиаторов; торможение нейрогенеза и развитие нейровоспаления в результате усиления активности провоспалительных цитокинов [21].

По литературным данным, описывающим экспериментальные и клинические исследования, острый и хронический стресс демонстрирует влияние на функции обучения и памяти. При этом стресс у животных может приводить к структурным изменениям в областях гиппокампа (атрофия и снижение объема, подавление пролиферации нейронов в зоне зубчатой извилины), что может привести к возникновению когнитивного дефицита [22].

В настоящее время взаимосвязь между стрессом, старением и проявлениями изменений в когнитивной сфере у пожилых людей можно описать с помощью нескольких механизмов. Наиболее изученным из них является активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) оси со стимуляцией высвобождения глутамата (глутаминовой кислоты, ГК) в результате продолжительного воздействия хронического стресса [23]. Вследствие стресса кортикостерон высвобождается из коры надпочечников в кровоток, проникает сквозь гематоэнцефалический барьер в головной мозг и распределяется в различных его участках, включая кору, гиппокамп и миндалину, вызывает модуляцию высвобождения различных нейротрансмиттеров. Например, высвобожденный глутамат взаимодействует с

нейронами этих регионов, вызывая как функциональные, так и нейроанатомические изменения. Специфически проявляются инволюционные изменения мозга, связанные с оказанием нейротоксических эффектов ГК в гиппокампе, где они формируют нейрональный энергетический баланс и влияют на процессы обучения и памяти. Вследствие этого происходит уменьшение числа нейронов в области мозга, коррелирующее со снижением когнитивных функций. При этом стрессогенные нейротоксические эффекты ГК в коре головного мозга у взрослых экспериментальных животных и людей являются обратимыми при стимулировании внутрисоциальных взаимодействий [24].

Интересным является обнаружение взаимосвязи повышения общего объема распределения белка-транслокатора (TSPO), который является маркером активации микроглии, с длительностью основного лечения депрессивного расстройства, а также с общей продолжительностью заболевания и воздействием антидепрессантов. При этом увеличение активности микроглии коррелирует с воспалительными процессами в головном мозге в ответ на повреждение ЦНС [25].

1.8 Области мозга, подверженные изменениям при депрессии

Психологические факторы и стрессовые эпизоды, перенесенные соматические заболевания, увеличение концентрации факторов роста, провоспалительных цитокинов и гормонов, могут вызывать морфологические и функциональные изменения в структурах головного мозга, ассоциированных с развитием депрессии. Эти изменения происходят в нейротрансмиттерных и нейроэндокринных системах, регулирующих адаптивные реакции организма, таких, как гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система, глутаматергическая, дофаминергическая, серотонинергическая системы. Перечисленные системы, так или иначе, влияют на нейропластичность головного мозга, его способность функционально и структурно адаптироваться к внешним стимулам. Она сопряжена с факторами генеза синапсов и их элиминацией, нейрогенезом и разрушением клеток [26]. Наиболее подверженными к изменениям в ответ на стресс являются такие компоненты

лимбической системы головного мозга, как базолатеральная миндалина, гиппокамп и энторинальная кора.

Среди них центральное значение занимает гиппокамп. Он участвует в процессе отбора и закрепления эмоционально значимых событий, регулирует двигательную и исследовательскую активность, контролирует адаптацию ГГН системы к стрессогенным воздействиям. Гиппокамп отвечает за обучение, пространственное ориентирование, эпизодическую память и нейроиммуномодуляцию [27]. Эта область активно вовлечена в процесс нейрогенеза, который у людей и грызунов постнатально преимущественно происходит в субвентрикулярной зоне боковых желудочков и субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа. Предыдущие исследования показали, что различные цитокины, включая интерлейкин-1-бета (ИЛ-1 β), ИЛ-6 и ФНО- α , как известно, активируются как на периферии, так и в головном мозге пациентов с крупными депрессивными расстройствами, увеличивая проницаемость гематоэнцефалического барьера и, в конечном счете, вызывая изменения в отдельных областях мозга, включая гиппокамп [13].

Базолатеральная миндалина участвует в процессах восприятия, переживания и выражения эмоций. Формирующиеся эмоции в этой области взаимодействуют с орбитофронтальной корой, отвечающей за принятие решений. Миндалина осуществляет прямой контроль деятельности гипоталамуса и при нарушении связей между ними происходят патогенетические нарушения ответа на стрессовые ситуации [28].

1.9 Депрессия у крыс

Механизм формирования депрессии у лабораторных животных сходен с таковым у человека и включает как морфофункциональные (нейроанатомические, нейрофизиологические, нейрохимические), так и патопсихологические компоненты [29].

Животные модели используются для понимания развития психопатологии, отражая последовательность психологических процессов, подчиняющихся определенным законам. Большинство моделей опираются на проведение

различных манипуляций для оценки поведения животных, имеющих известные биологические последствия. В настоящий момент наиболее востребованными моделями депрессии являются модели: хронического непредсказуемого стресса (прогностическая валидность усиливается с течением времени, а также отражается несколько стадий развития хронического стресса: тревога, резистентность, компенсация, субкомпенсация и истощение), стресса раннего периода жизни (позволяет оценить предрасположенность развития психопатологии за счёт фенотипических изменений), социального стресса (позволяет изучить молекулярные механизмы вызывающие стабильные изменения ЦНС), выученной беспомощности (имеет высокую прогностическую валидность за счёт поведенческой схожести с человеческой депрессией, позволяет оценить эффективность антидепрессантов) и водно-иммерсионная модель (используется при оценке ложноположительных результатов использования препаратов).

Оценка нейropsychического статуса экспериментальных групп для определения эффективности сформированной модели является одним из основных подходов оценки ее развития. Для этого при моделировании депрессии проводятся следующие нейropsychические тесты: тесты для оценки стрессогенности («открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», тест на вынужденное плавание, подвешивания за хвост), гедонистической чувствительности (фиксируется, будет ли животное отказываться от сладкой пищи при стрессе) и гипонеефагии (принятие или отказ от новой, ранее не известной, пищи) [29].

Таким образом, модели на животных являются классическими для оценки многих процессов, например, в токсикологии, но могут использоваться и для понимания патогенеза, молекулярных и психических изменений при развитии депрессии, хотя и есть сложности при экстраполяции результатов тестирования животных на изменения у человека [30].

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования и дизайн эксперимента

Объектом исследования являлись половозрелые самки крыс линии Wistar возрастом 3-4 месяца и весом 250-300 г. Животные были разделены на 5 групп: интактные животные (далее обозначены как «Инт»; n=8), группы контроля с введением физиологического раствора («К+ф.р-р»; n=8) и α -интерферона («К+ИФН»; n=9), крысы с выработанным острым стрессом при приложении физиологического раствора («ОС+ф.р-р»; n=8) и α -интерферона («ОС+ИФН»; n=9), соответственно (Приложение А).

Модель депрессии (острого иммобилизационного стресса) воссоздавалась путем их иммобилизации в узких индивидуальных пеналах (резком ограничении двигательной активности) в течение 30-ти минут (Приложение Б).

Эвтаназию крыс проводили путём декапитации и производили забор исследуемых областей головного мозга (кора передних полушарий головного мозга и средний мозг). Забор материала проводили на 7-е сутки с момента первичного инъектирования α -интерфероном и физиологическим раствором.

2.2 Применяемые растворы

Для проведения исследования использовался раствор « α -интерферон человеческий лейкоцитарный 2-b» («Микроген») в дозировке 5000 МЕ на кг веса животного (при которой в проводимом ранее Смирновой К.В. пилотном эксперименте не наблюдалось смертности животных, но отмечалась ответная реакция организма на однократное воздействие), растворителем являлся физиологический раствор (0,89% раствор NaCl). Для исключения вероятности влияния на результаты эксперимента факта инъекции, который является стрессогенным фактором и может причинять животным небольшую боль, и в качестве растворителя, были добавлены группы сравнения с инъекциями физиологического раствора в объеме 1 мл на кг веса животного (такой же объем растворителя, что и в случае введения альфа-интерферона). Приложение растворов было 5-кратным (растворы вводили ежедневно в одно и то же время в течение 5 дней подряд).

2.3 Проводимые тестирования

Тесты для поведенческого фенотипирования животных включали в себя шкалу для оценки неврологического дефицита, тесты на оценку эмоционального состояния крыс и стрессогенности (для исключения или подтверждения развития депрессия-подобного поведения).

2.3.1 Неврологическая шкала NSS (Neurological Score System)

Для оценки наличия очаговой симптоматики повреждения мозга проводился стандартный неврологический тест, позволяющий исследовать в динамике состояние моторной, рефлекторной, координаторной и сенсорной функций. О тяжести эмоционального стресса судили в баллах по степени неврологического дефицита, оцениваемого по шкале NSS – стандартном варианте: оценивалось состояние крыс после формирования острого стресса, а также «отсроченные эффекты инъекирования интерфероном» при 5-кратном приложении (Приложение В).

2.3.2 Тест на гипонеофагию (ТГНФ)

ТГНФ основан на изучении потребления грызунами ограниченного количества нового корма в новой для них обстановке. Согласно литературным данным, крысы изначально будут потреблять лишь небольшое количество незнакомой пищи, ввиду отсутствия у них рвотного рефлекса, снижающего риск отравления незнакомой пищей. Помещение животного в новую среду индуцирует стресс. В такой ситуации, если потребление пищи сократилось, это может быть принято в качестве количественной меры стресса. Следовательно, препараты, которые увеличивают стресс-реакцию, как правило, должны усиливать эффект новизны во время приема пищи. Биологические основы такого поведения становятся очевидными, если учесть, что незнакомая пища может быть токсична, а ее употребление в больших количествах, без тщательного исследования, может быть даже смертельным, тревожные/депрессивные животные с большей вероятностью не будут стремиться попробовать новую для них пищу [31].

Исследуемая особь на 5 минут помещается в чистую стерильную пустую клетку, в центре которой лежит незнакомая для нее пища. Фиксируется количество подходов к пище, время начала поедания, общее время поедания и объемы съеденной пищи. Обнюхивание или кратковременное облизывание еды (менее 2-3 с) не является причиной окончания латентного периода. Отказ грызунов от новой пищи можно расценивать как показатель высокого уровня тревожности, который может быть также вызван введением исследуемого вещества. В случае достаточно большого количества таких грызунов их можно выделить в отдельную выборку [31].

2.3.3 Тест «открытое поле»

Для выявления нарушений двигательной активности (спонтанной (свободной) горизонтальной и вертикальной); постуральной нестабильности (нарушение способности удерживать равновесие в той или иной позе или при изменении позы); вегетативных функций (увеличение количества и изменение консистенции болюсов, увеличение частоты уринации); эмоциональности (увеличение времени замирания крысы, снижение частоты или отсутствие грумминга) проводился тест «открытое поле» [32].

Оценку выраженности вегетативных нарушений в тесте «открытое поле» при постановке модели проводили сразу же после формирования депрессии, а также через сутки с момента формирования острого стресса.

Тест «открытого поля» проводили в круглой площадке диаметром 97 см, ограниченной бортами высотой 42 см. Животное тестировали в течение 8 минут, при посадке крысы в тест фиксировали латентный период, остальные параметры определяли в течение 3 последних минут (согласно литературным данным, в первые 5 минут тестирования поведение крыс связано с чувством страха, а на 6-12 минуте появляется исследовательское поведение). Фиксация поведенческих факторов, характеризующих целостное поведение: время замирания, перебежек, число стоек, количество пересеченных линий (горизонтальные движения), количество болюсов дефекации и частоты уринации, заглядывание в отверстия

(проявление поисковой активности), грумингов (умывание – типичное поведение) [32].

Часть параметров, таких как скорость и траектория движения крыс фиксировались и обрабатывались с помощью программы для видеотрекинга ANY-maze (фирма Stoelting Co., США), а остальные проводились вручную при анализе видеофайлов (Приложение Г).

2.3.4 Приподнятый крестообразный лабиринт

Тестом для оценки эмоционального состояния, тревожности, боязни высоты, параметров оценки риска, исследовательской и двигательной активности грызунов в условиях стрессогенности при свободном выборе крысой условий (комфорта/дискомфорта), является тест «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ).

В установке ПКЛ можно регистрировать целый ряд параметров, таких как количество посещений и время пребывания в открытых и закрытых рукавах, наличие стоек (животное привстает на задние лапы) в открытых и закрытых рукавах, эпизоды груминга и их продолжительности, замирания, количество болюсов (дефекаций) и уринаций. По данным статей, интактные крысы с большим предпочтением проводят время в открытых рукавах лабиринта, чем подвергнутые стрессу особи. Таким образом, увеличение времени пребывания животного в закрытых рукавах может свидетельствовать о его беспокойстве или о страхе открытых пространств/высоты. Беспокойные грызуны с большей вероятностью проявят неподвижность в течение продолжительного времени и увеличение актов дефекации в открытых рукавах по сравнению с закрытыми, стрессогенность животных можно определить по предпочтению темных участков светлым, боязни высоты, выраженности и динамике поведения "выглядывания". На основе отношения времени, проведенного в открытых рукавах, ко времени, проведенному в закрытых рукавах, можно оценить тревожность/депрессия-подобное поведение животных, а нормальное поведение будет характеризоваться увеличением времени, проведенном в открытых рукавах или увеличению числа входов в них. Увеличение времени пребывания в

открытых рукавах, с одной стороны, может отражать исследовательскую активность (врожденную мотивацию осваивать новые пространства), а, с другой стороны, проявляться при неспособности крыс различать освещенность лабиринта (например, нарушение светочувствительности сетчатки глаза) или при высокой локомоторной активности, вызванной особенностями процессов дофаминергической трансмиссии, напоминающей картину синдрома гиперактивности/дефицита внимания у человека [33].

Поведение крыс исследовалось на установке, помещенной в 1 метре от пола и состоящей из двух открытых рукавов 50x10 см и двух закрытых рукавов 50x10 см, расположенных перпендикулярно друг относительно друга. При тестировании животное помещали в центр лабиринта и проводили видеорегистрацию в течение 3 минут (Приложение Г). По времени пребывания в закрытых и открытых «рукавах», количеству заходов в них и длительности нахождения животного в центре оценивалось состояние крыс. Тревожное поведение грызунов определяли по отношению времени, проведенного в открытых рукавах, к времени, проведенному в закрытых рукавах, а анти-тревожное поведение - по увеличению времени пребывания в открытых рукавах и количеству заходов крысы в них.

2.4 Работа с биологическим материалом

2.4.1 Подготовка материала, приготовление срезов

Производили забор исследуемых областей головного мозга (энторинальная кора головного мозга, гиппокамп с зубчатой извилиной и базолатеральная миндалина) из одной половины головного мозга во всех исследуемых группах животных, готовили «свободно-плавающие» срезы (половину головного мозга фиксировали 48 часов в 10% физ. раствор-забуференном формалине, далее не менее 48 часов держали в 30% сахарозе, на вибротоме «Microm HM 650V» компании Thermo Fisher Scientific (США), нарезали сагиттальные срезы головного мозга толщиной 70 мкм).

2.4.2 Иммуногистохимия

Оценку экспрессии антигенов на «свободно-плавающих» срезах проводили по стандартной методике одновременного комбинированного окрашивания препарата (протокол для «свободно-плавающих» срезов фирмы Abcam представлен в приложении Д). Окраска проводилась в 12-луночных планшетах, все этапы окраски и промывки проводились с использованием шейкера, для инкубации с антителами и остальными растворами добавлялось по 750 мкл раствора в лунку. Неспецифическую активность блокировали 2-часовой инкубацией при комнатной температуре с раствором Washing solution (0,2% Triton X-100 в PBS). Разведение антител производили в AB-solution (0,2% Triton X-100 и 3% BSA в PBS). Инкубацию с первичными антителами (мышинные анти-ИФН- α в рабочем разведении 1:250; кроличьи анти-ИФН- γ в рабочем разведении 1:100) проводили следующим образом: инкубировали с ними срезы ночь при 4°C, затем продолжали инкубацию 2 часа при комнатной температуре. Инкубацию с вторичными антителами (козьи анти-мышинные Alexa 488 для зеленого канала флуоресценции и козьи анти-кроличьи Alexa fluor 555 для красного канала флуоресценции) в рабочем разведении 1:1000 проводили 2 часа при комнатной температуре. На всех этапах осуществляли 2-3-кратную промывку образцов 5-минутной инкубацией с раствором Washing solution. Завершающим этапом был перенос срезов на стекло и нанесение 15 мкл монтирующей жидкости (50% глицерин в PBS с DAPI в концентрации 2 мкг/мл) на срез, препарат накрывали покровным стеклом и микроскопировали.

2.4.3 Флуоресцентная микроскопия

Микроскопию срезов с иммуногистохимическим окрашиванием проводили с помощью полностью автоматизированного флуоресцентного микроскопа ZOE™ Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, США).

Фотографии, полученные при проведении флуоресцентной микроскопии иммуногистоцитохимической оценки экспрессии антигенов в ткани головного мозга, представлены в Приложении Е.

При анализе фотоснимков использовали программу ImageJ 1.50i (ImageJ, США). Производился подсчет относительного количества клеток (в процентах), экспрессирующих изучаемый антиген, от общего числа клеток, экспрессирующих соответствующие антигены по-отдельности.

2.5 Анализ данных

Для статистического анализа использовали программу StatPlus 2006 с использованием методов непараметрической статистики (критерий Манна-Уитни). Затем полученные данные были представлены в виде диаграмм «ящик с усами», в которых представлены медиана, межквартильный размах, среднее, минимальное и максимальное значения (Приложение Ж).

Статистически значимыми принимались уровни значимости $p < 0,05$ и менее. В качестве обозначений уровней значимости использованы: * - при сравнении экспериментальных групп с «Инт», # - при сравнении «ОС+ИФН» с «ОС+ф.р-р», «К+ИФН» с «К+ф.р-р», ^ - при сравнении «ОС+ИФН» и «К+ИФН», «ОС+ ф.р-р» и «К+ ф.р-р».

Градации уровня значимости: *, #, ^ – приемлемая граница значимости ($p \leq 0,05$); **, ##, ^^ – результат значим ($p \leq 0,01$); ***, ###, ^^ ($p \leq 0,005$) и ****, ####, ^^ ($p \leq 0,001$) - результат высоко значим.

3 Результаты и обсуждение

3.1 Результаты тестирований

3.1.1 NSS-тест

Полученные данные NSS-теста (Рисунок 1) свидетельствуют о наличии во всех группах животных повреждений слабо выраженного неврологического дефицита (отражает повреждение умеренной степени тяжести, связанное, главным образом, с несовершенством мышечной силы у животных, что отражалось в виде появления баллов в основном при оценке равновесия на балансире при падении животных с него), что свидетельствует об отсутствии каких-либо серьёзных неврологических нарушений и исключает наличие нейродегенеративных заболеваний ЦНС.

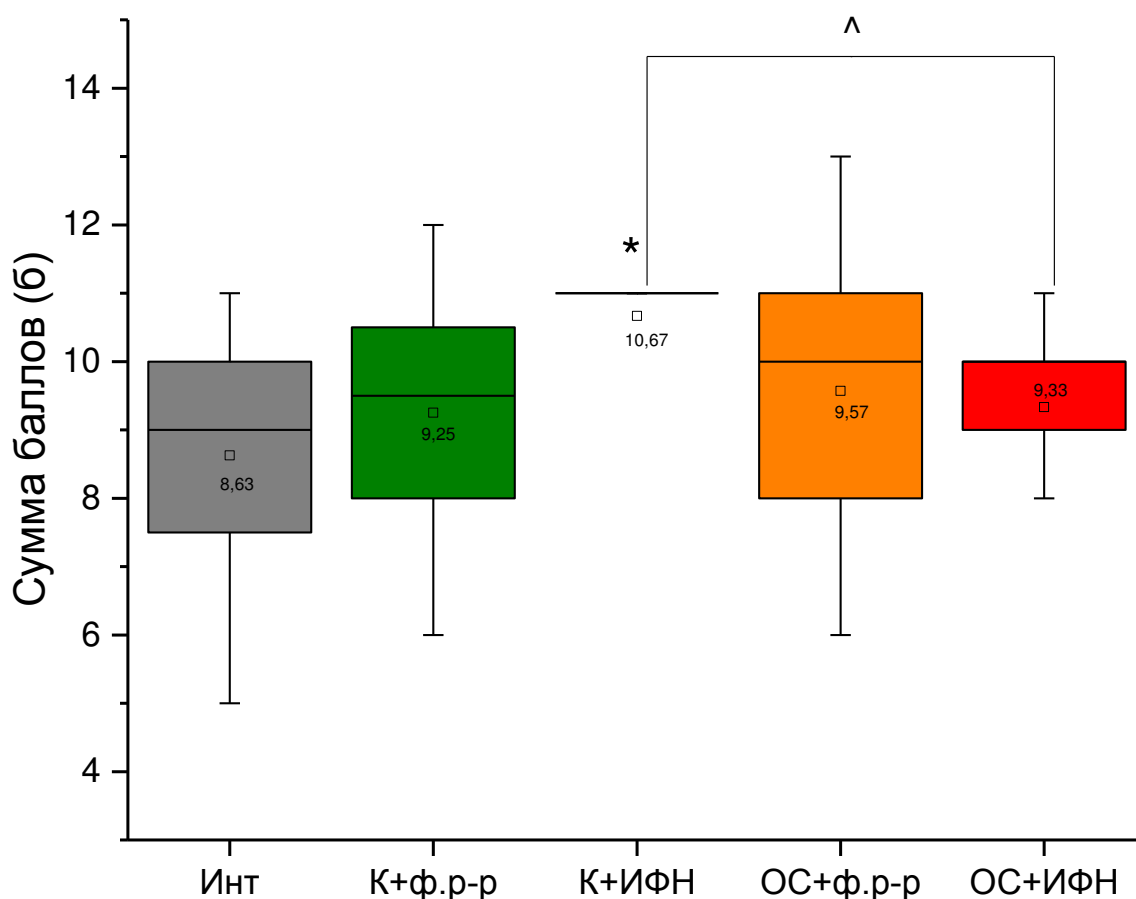


Рисунок 1 – Неврологический дефицит (сумма баллов в NSS тесте).

При этом отмечалось усиление неврологического повреждения (увеличение суммы баллов в тесте NSS у всех экспериментальных и контрольных групп в сравнении с интактными животными, что может быть связано со стрессогенным воздействием факта инъекций животным, однако наиболее выражен данный эффект после введения интерферона, что может указывать о нейротоксическом действии альфа-интерферона. У группы с выработанным острым стрессом более низкие показатели NSS-теста при введении ИФН, в сравнении с контрольной группой также при введении ИФН, могут быть связаны с предшествующим резким повышением уровня глюкокортикоидов, что может ингибировать выработку цитокинов в головном мозге и блокадой нейровоспаления, как это было описано в литературе [34].

3.1.2 Гипонеофагия

Тест на гипонеофагию (Рисунок 2) не показал значимых различий в степени заинтересованности пищей между всеми экспериментальными группами, что может быть связано с малым объемом выборок и достаточно большим разбросом полученных результатов, однако показал тенденцию к увеличению заинтересованности пищей при действии интерферона в сравнении с интактными животными и введением физиологического раствора, что может быть связано с потенциальным нейропротективным влиянием альфа-интерферона, однако данное изменение требует дальнейшего подтверждения на большем объеме выборок.

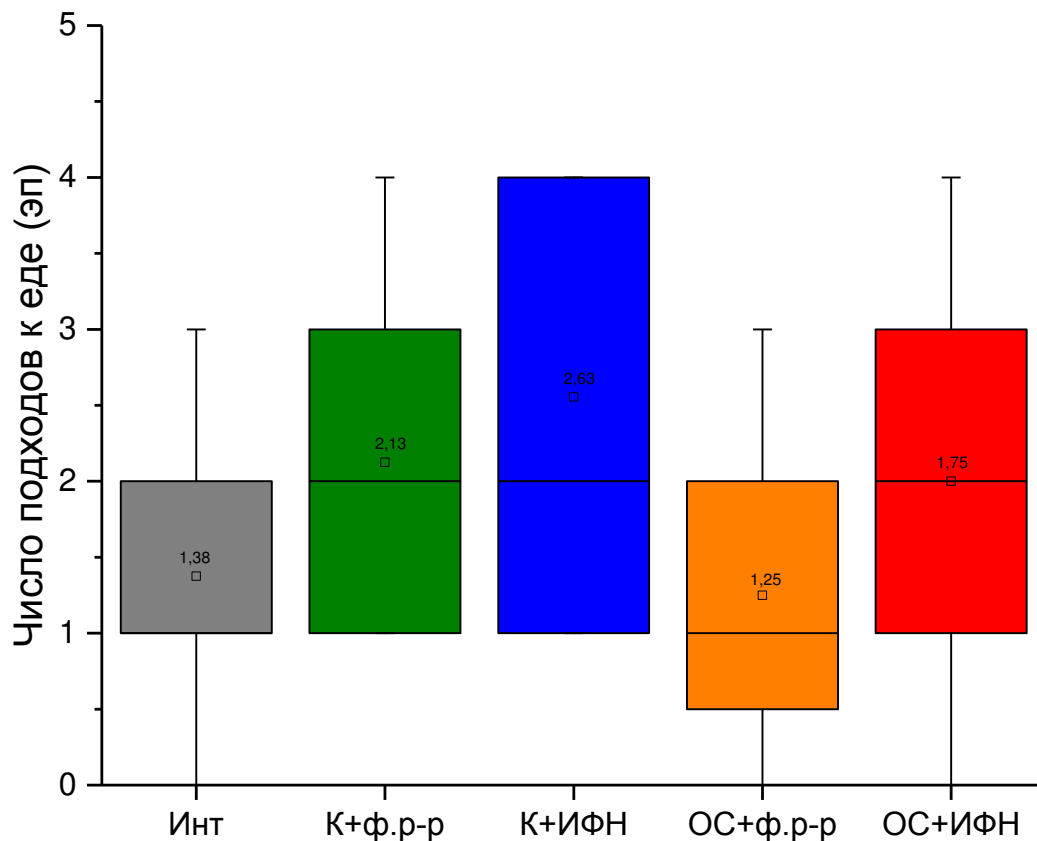


Рисунок 2 – Гипонеофагия (число подходов к пище)

3.1.3 Тест «Открытое поле»

В тесте открытое поле было выявлено значимое снижение как пройденной дистанции, так и средней скорости перемещения у группы «К+ИФН» и тенденции к их снижению при действии интерферона на группу с острым стрессом в сравнении с интактными животными и животными с приложением физиологического раствора (Рисунок 3).

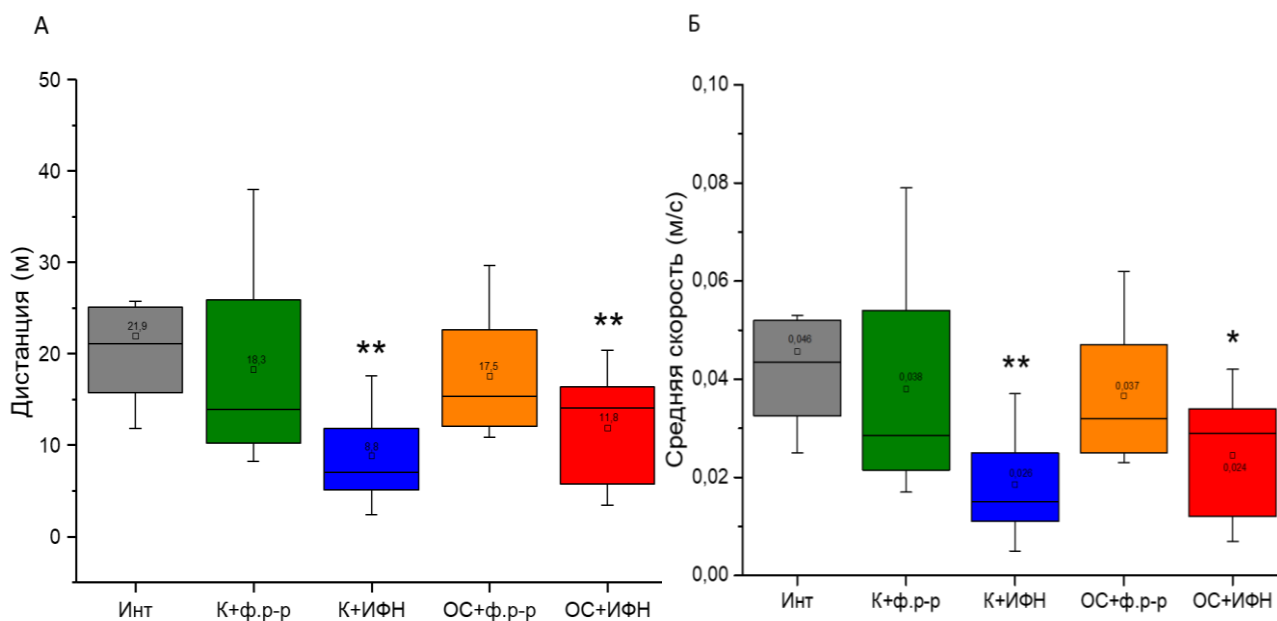


Рисунок 3 – Результаты теста «открытое поле»: А – Пройденная дистанция (м); Б – Средняя скорость (м/с) перемещения крыс.

Низкая двигательная активность характерна для животных, испытывающих страх, который, в свою очередь, сильнее проявляется у животных, находящихся в депрессия-подобном состоянии, вследствие пережитого острого стресса. Для групп с введением α -ИФН это может свидетельствовать о его нейротоксическом эффекте и усилении признаков депрессии.

Стремление к нахождению в менее освещенном и открытом, за счёт бортов установки, внешнем поле, является естественным для крыс поведением. При этом у испытывающих депрессия-подобное поведение животных это усугубляется низкой двигательной активностью. Крысы из группы с выработанным острым стрессом после введения интерферона реже заходят во внешнее поле, но проходят при этом большую дистанцию в этой зоне. В контрольной группе после введения интерферона фиксируется значительное снижение двигательной активности со снижением пройденной дистанции (Рисунок 4).

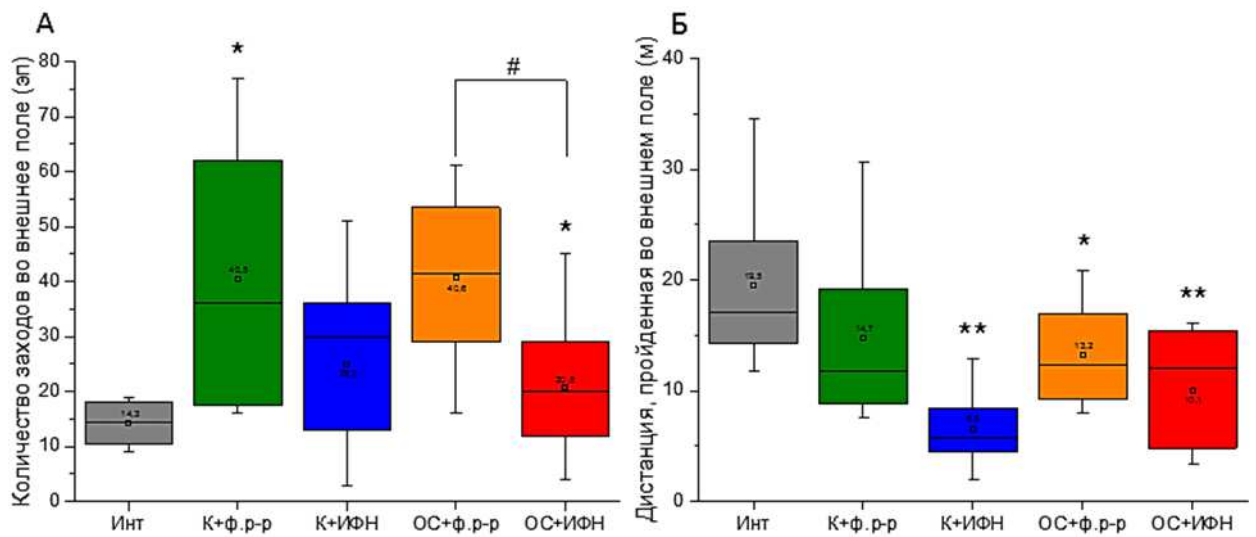


Рисунок 4 – Результаты теста «открытое поле»: А – количество заходов во внешнее поле (эп); Б – Дистанция, пройденная во внешнем поле (м).

Время исследования нор (Рисунок 5) характеризует исследовательское поведение животных. В целом, создание стресса и проведение инъекций приводило к снижению исследовательского поведения в сравнении с интактными животными, что может быть связано со стрессогенностью проведения инъекций у этих животных.

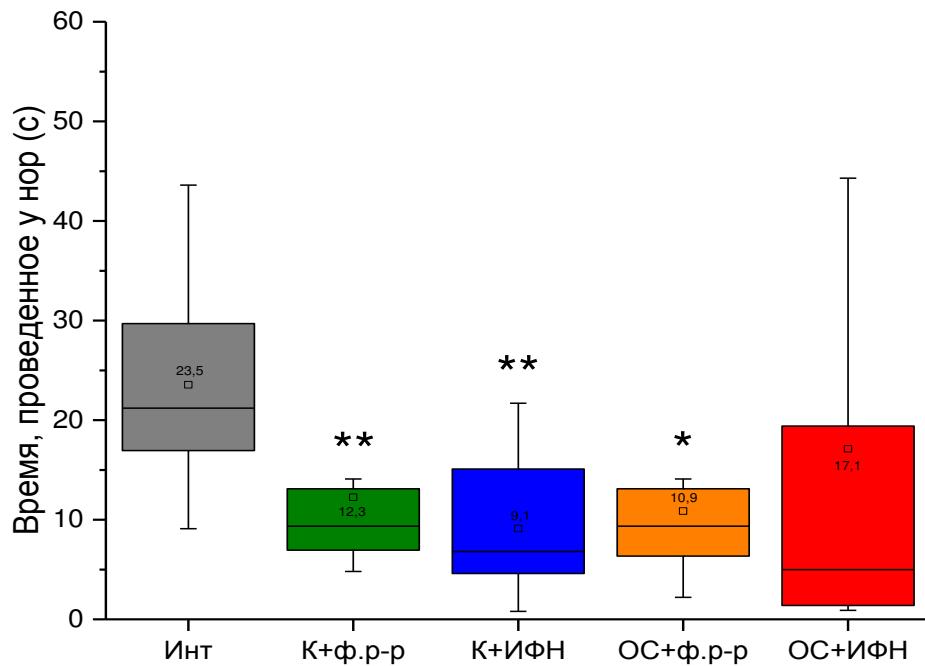


Рисунок 5 – Результаты теста «открытое поле»: Время, проведенное у нор (с).

Количество пересечений показывает активность передвижения животных и подтверждает её снижение, сопоставимое со степенью испытываемого животными стресса. Наименее активными оказались группы с введением интерферона. Введение физиологического раствора или интерферона контрольным группам усиливало стресс (Рисунок 6).

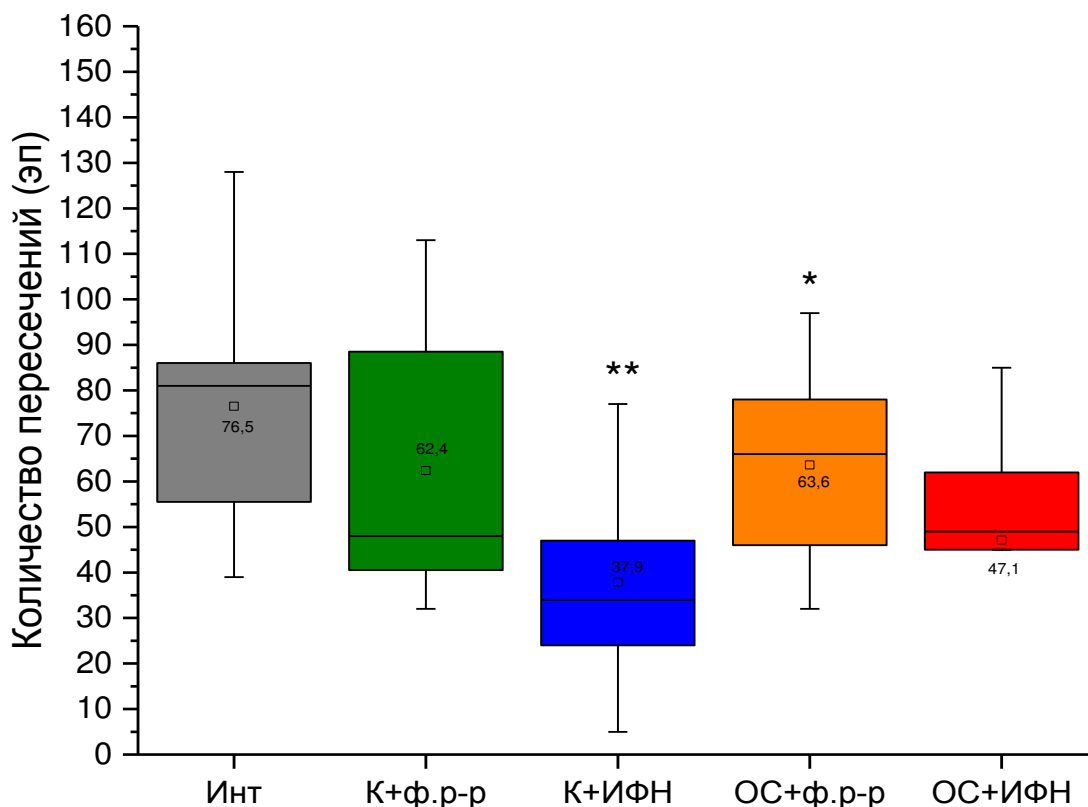


Рисунок 6 – Результаты теста «открытое поле»: Количество пересечений (эп).

Были получены типичные видеотреки (Приложение Г), подтверждающие выявленные закономерности при депрессивном поведении при изучении «стрессогенности новизны» в тесте «открытое поле»: снижение двигательной активности и усугубление «периферического» поведения; животные контрольной группы с введением физиологического раствора более свободно передвигаются по всей периферической части теста, тогда как группы с приложением интерферона «предпочитают» находиться в отдельных частях внешней зоны теста, особенно выражено такого рода поведение у группы без предварительно моделированного стресса.

3.1.4 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Тест ПКЛ представляется из себя тест с переменной стрессогенностью («низкая стрессогенность» в «закрытых рукавах» теста при «высокой

стрессогенности» в «открытых рукавах»). Нахождение в «открытых рукавах» и центральной части характеризует наличие у крыс исследовательского интереса, не характерного для подавленных животных, испытывающих стресс. В данном тесте были замечены усугубления показателей во всех экспериментальных группах. Дистанция, пройденная в открытых рукавах группой «ОС+ИФ» значительно ниже, чем у группы «ОС+ф.р-р», что подтверждает усугубление депрессия-подобного состояния у крыс при инъекции α -ИФН (Рисунок 7, Приложение Г).

Интактные животные провели значительно больше времени в центральной части (Рисунок 8), в сравнении с «К+ф.р-р», что свидетельствует о перенесенном стрессе при введении инъекций. Сравнение групп с введением интерферона между собой показывает более выраженное снижение активности животных у группы без формирования острого стресса. Интересен тот факт, что в отношении времени и дистанции, пройденной в центральной части, при приложении интерферона при остром стрессе был получен интересный эффект – резкое увеличение времени нахождения в центральной части, хотя при этом животными почти не был пройден общий путь, что свидетельствует о «замирании» животных и согласуется с нейротоксическим действием при приложении альфа-интерферона, обнаруженным в тесте «открытое поле».

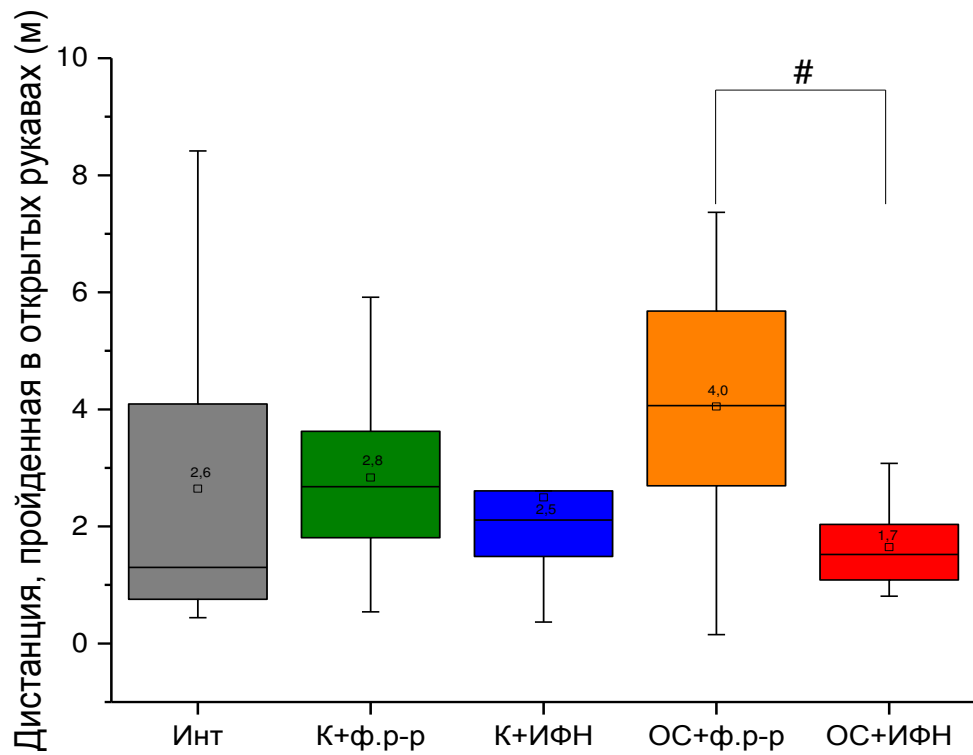


Рисунок 7 – Дистанция, пройденная в открытых рукавах (м).

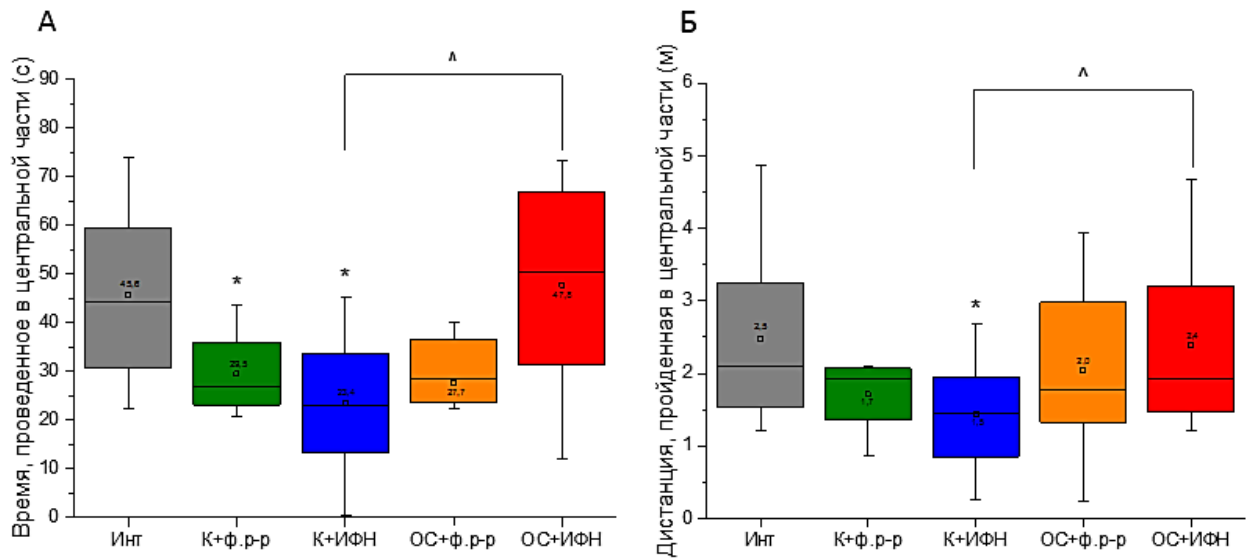


Рисунок 8 – Результаты теста «приподнятый крестообразный лабиринт»: А – Время, проведенное в центральной части (с); Б – Дистанция, пройденная в центральной части (м).

Таким образом, в целом, по данным нейроповеденческого тестирования, интерферон оказывает нейротоксическое действие и усугубляет проявления депрессия-подобного поведения как при остром иммобилизационном стрессе, так и у контрольных животных. В будущем данную особенность можно будет использовать при создании новых вариантов (в том числе комбинированных моделей) экспериментальной депрессии.

3.2 Результаты иммуногистохимии

3.2.1 Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к α -ИФН

Для выяснения степени нейротоксического влияния приложения α -ИФН, был изучен процент клеток, экспрессирующих рецепторы к интерферонам в различных областях (энторинальная кора, гиппокамп, базолатеральные миндалины) головного мозга крыс.

Результаты, полученные при обработке снимков энторинальной коры (Рисунок 9), свидетельствуют о значимом увеличении экспрессии клеток к α -ИФН практически во всех экспериментальных группах. Наиболее выражена экспрессия в группе «ОС+ИФН». Сравнение групп с приложением интерферона показало более высокий уровень экспрессии к рецепторам α -ИФН у группы с предварительно выработанным стрессом. Это можно объяснить выделением эндогенного α -ИФН вследствие развития воспалительного ответа иммунной системы на стресс и/или с эффектом сенсibilизации организма к нейровоспалительному ответу, наблюдаемого в литературе [35].

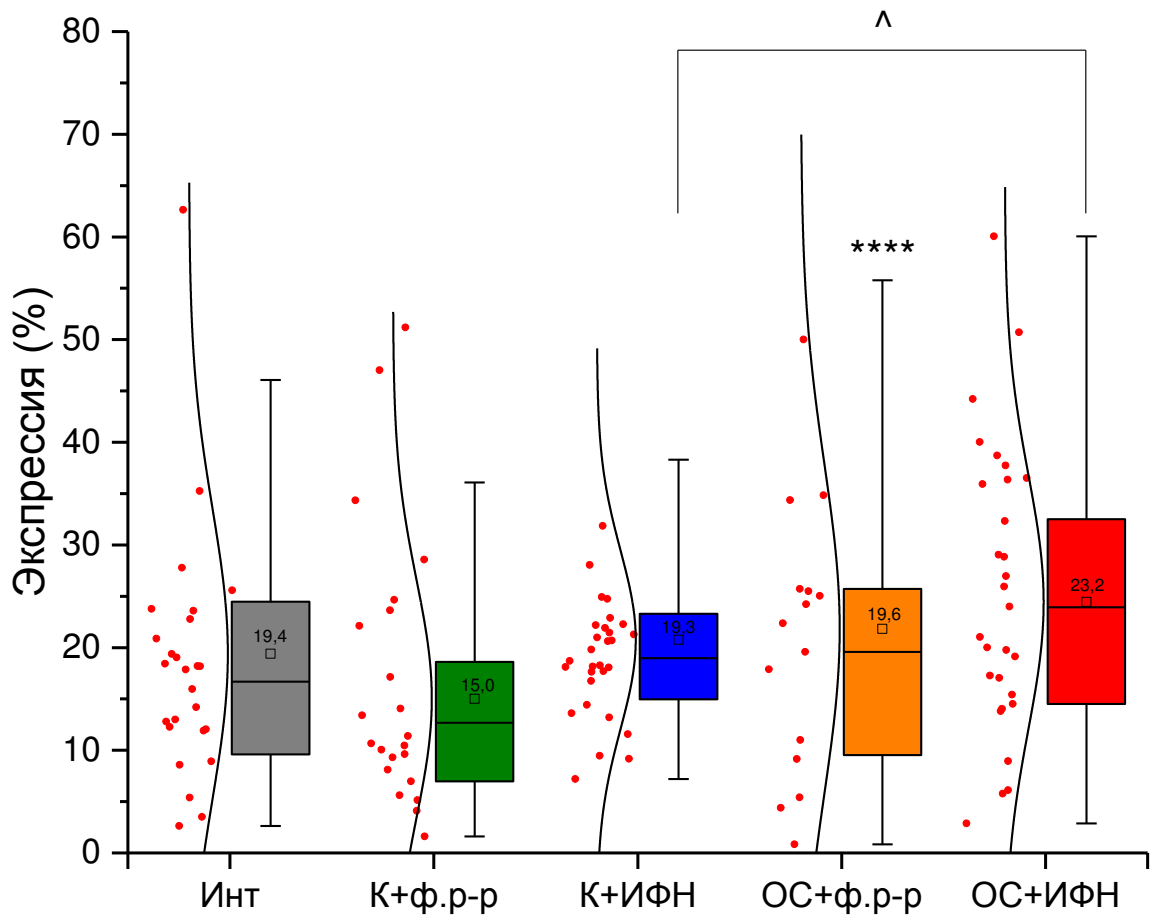


Рисунок 9 – Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к альфа-интерферону в энторинальной коре

При этом в гиппокампе, напротив, экспрессия значительно снижается практически во всех экспериментальных группах, кроме группы с приложением интерферона при остром стрессе, в которой не наблюдается значимых изменений, хотя и имеется тенденция к снижению в сравнении с интактными животными (Рисунок 10).

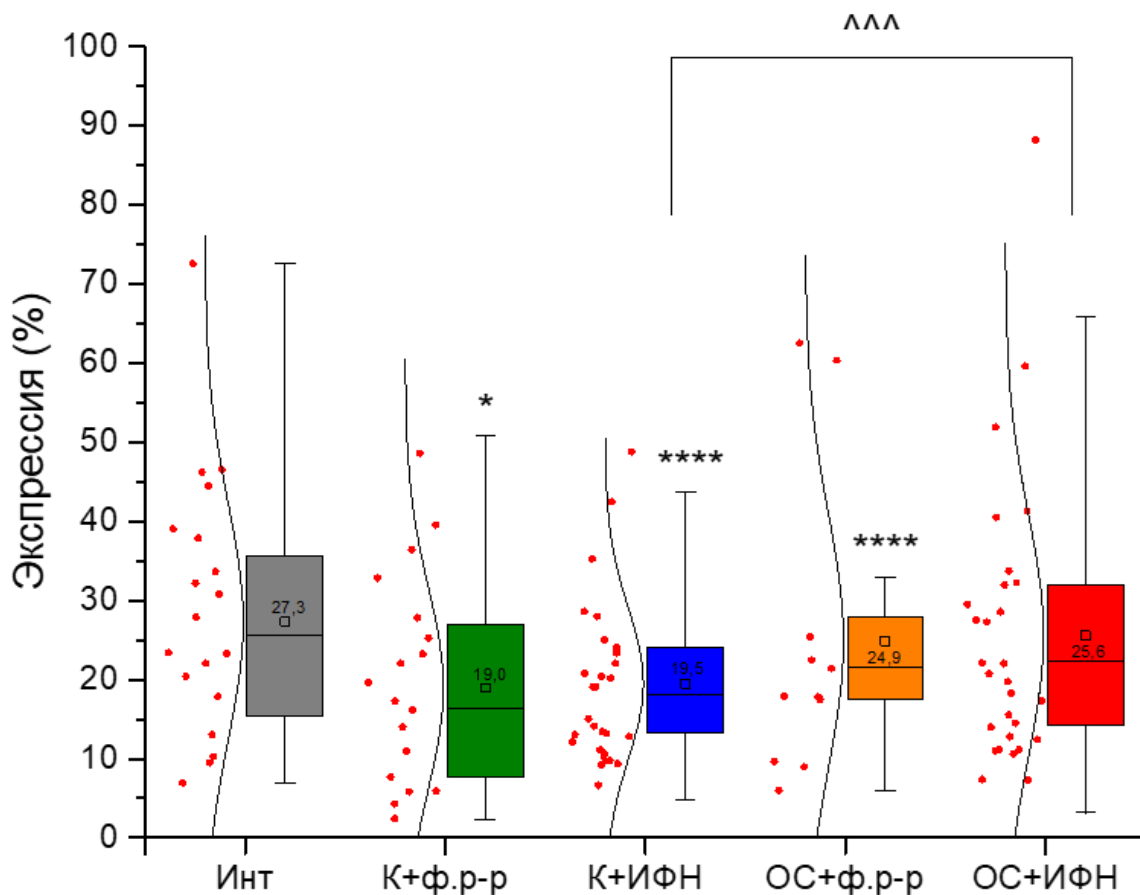


Рисунок 10 – Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к альфа-интерферону в гиппокампе.

Схожая картина наблюдается и в базолатеральной миндалине. Однако в этой области введение экзогенного α -ИФН повлияло на снижение экспрессии более выражено (Рисунок 11).

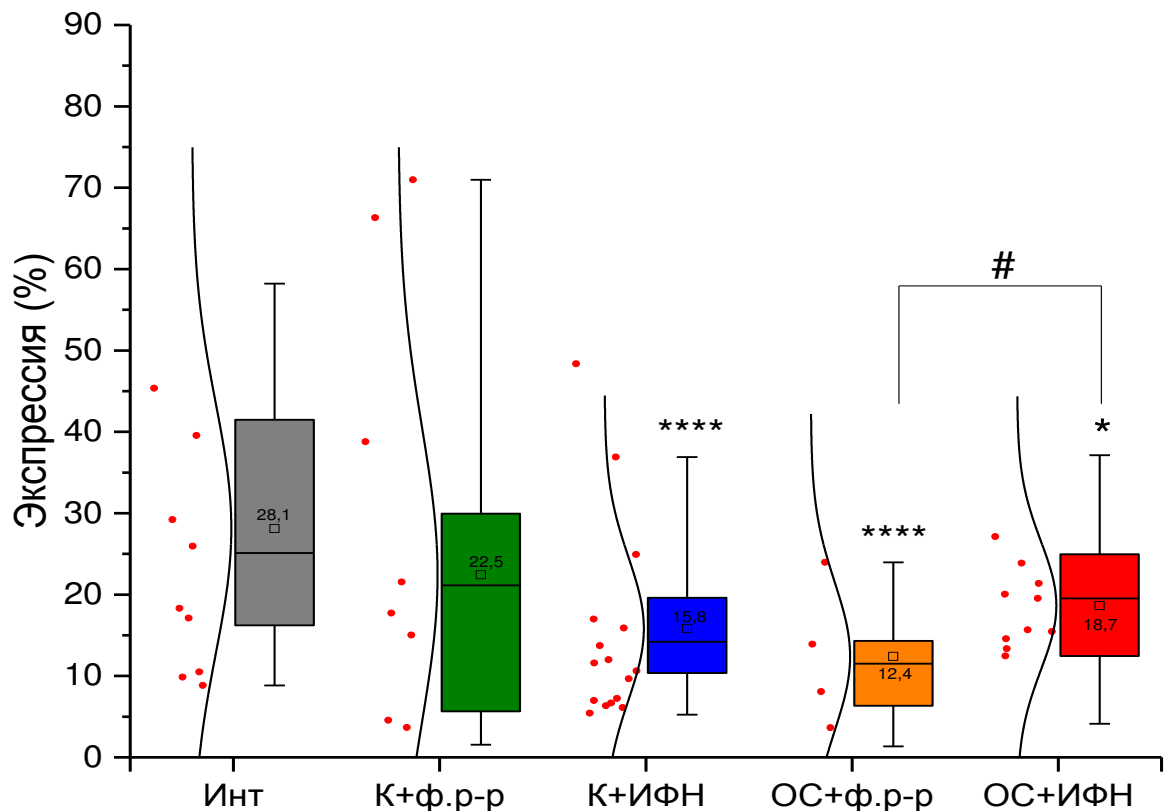


Рисунок 11 – Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к альфа-интерферону в базолатеральной миндалине

Таким образом, анализ относительного числа клеток, экспрессирующих рецепторы к альфа-интерферону, выявил значимое увеличение экспрессии этих рецепторов в энторинальной коре и значимое снижение в гиппокампе и миндалине, что может быть связано с выработкой клетками собственного интерферона для его подавления и с взаимодействием с ним и разным по времени реагированием на стресс структур мозга (раньше всего, по литературным данным, реагируют базолатеральные миндалины, затем гиппокамп, в последнюю очередь «реагирует» энторинальная кора) [36]. Также полученный результат может свидетельствовать о блокировке рецепторов к α -ИФН вследствие его чрезмерной продукции, индуцированной развитием нейровоспаления [21].

3.2.2 Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к γ -ИФ

Снижение экспрессии рецепторов к γ -ИФ практически во всех группах наблюдается в энторинальной коре (Рисунок 12), наиболее выражено данный эффект наблюдается при введении альфа-интерферона.

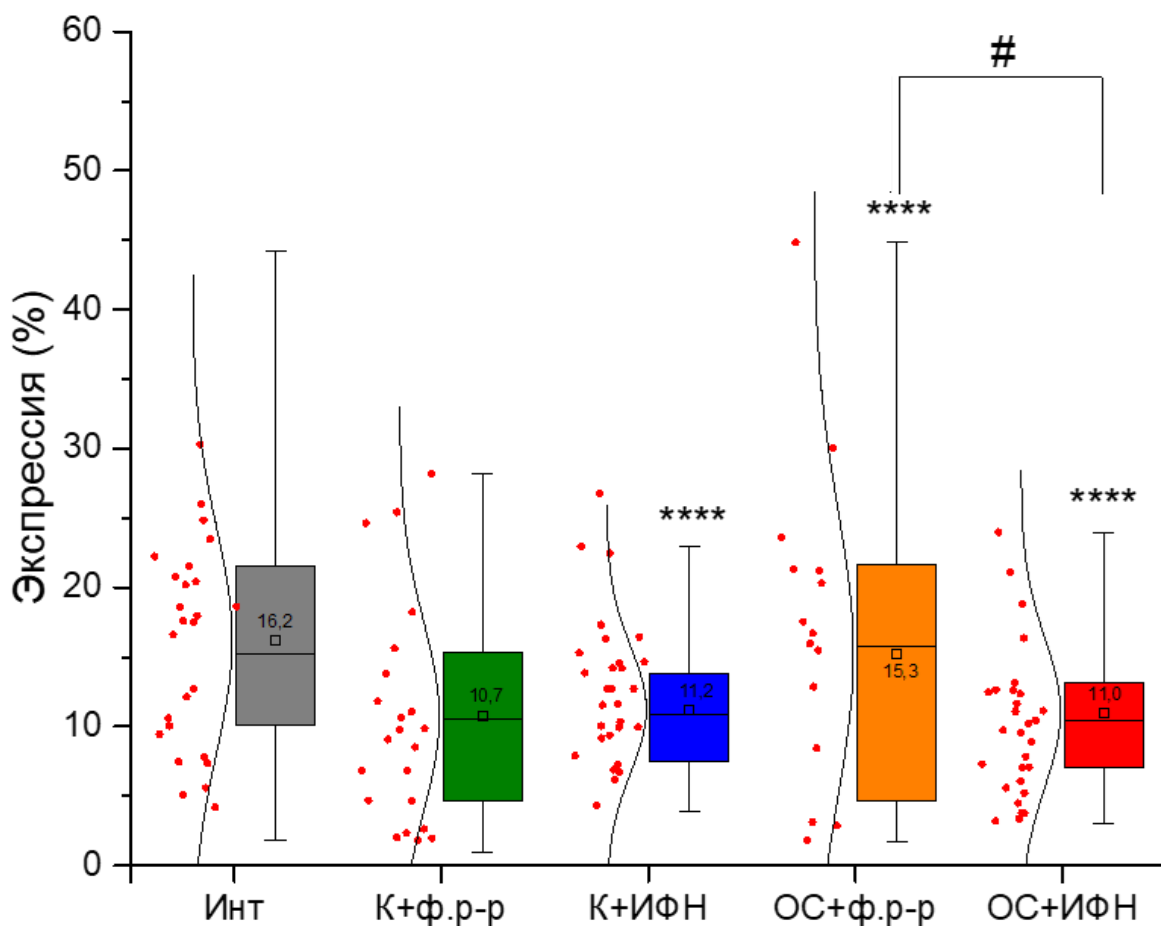


Рисунок 12 – Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к гамма-интерферону в энторинальной коре

В гиппокампе (Рисунок 13) и базолатеральной миндалине (Рисунок 14) наблюдаются такие же изменения: значительно снижается экспрессия к γ -ИФН во всех группах в сравнении с интактными животными, что можно объяснить блокировкой рецепторов к γ -ИФН при действии интерферона-альфа на «свои» рецепторы. При этом наиболее выраженные эффекты наблюдались практически во всех случаях при введении альфа-интерферона, в отличие от физиологического раствора.

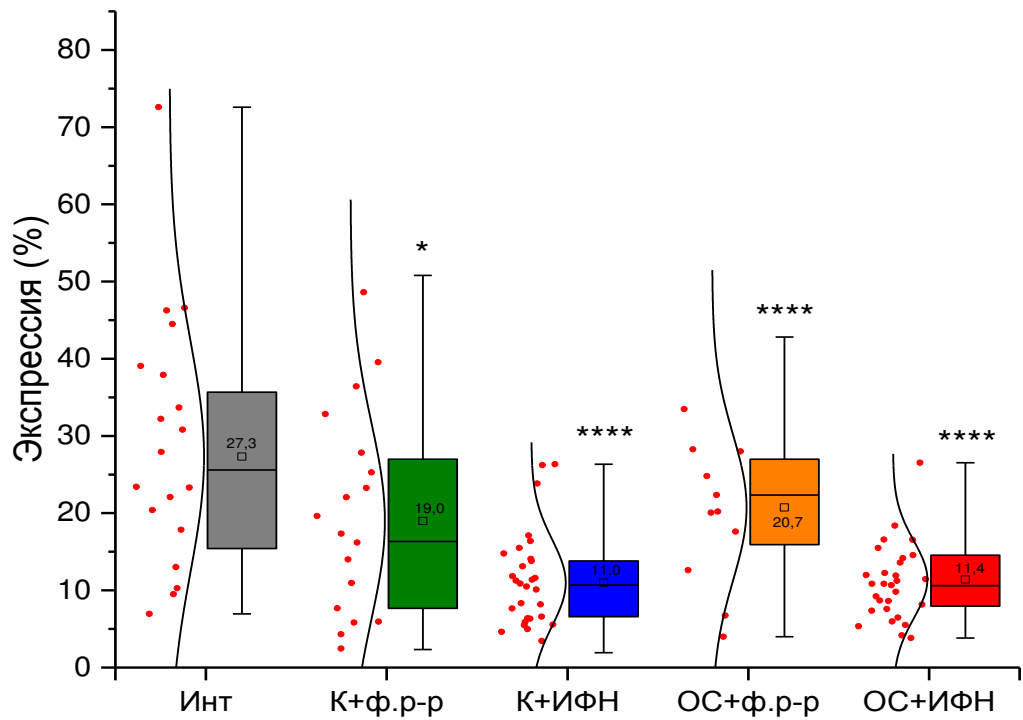


Рисунок 13 – Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к гамма-интерферону в гиппокампе

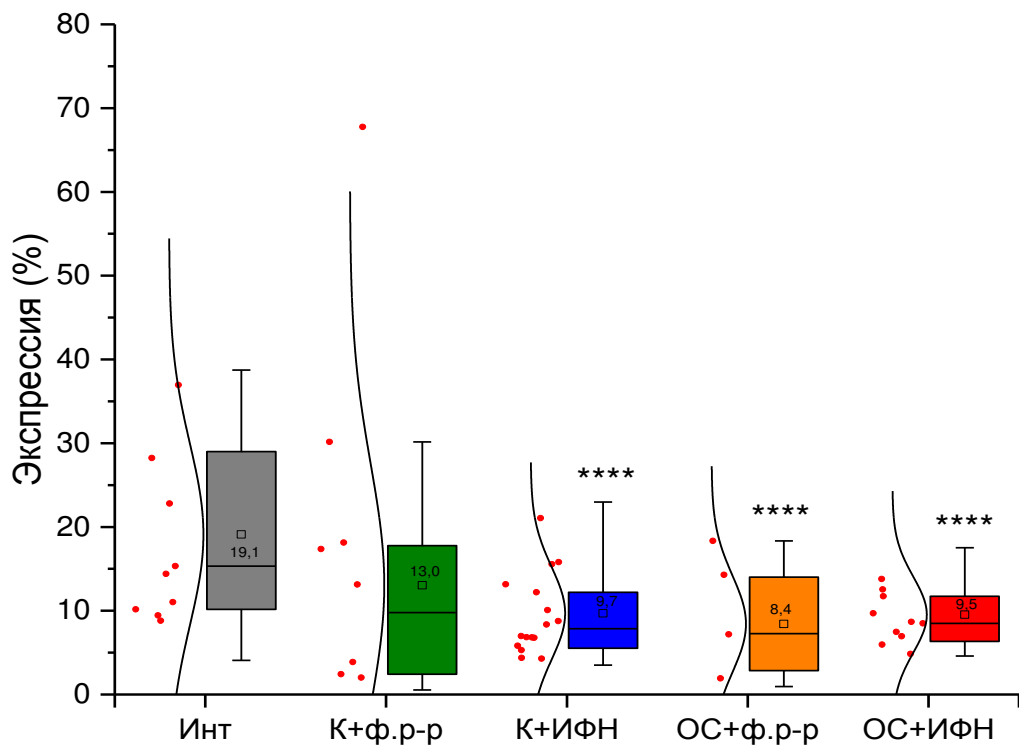


Рисунок 14 – Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к гамма-интерферону в базолатеральной миндалине

Таким образом, анализ процента клеток, экспрессирующих рецепторы к γ -ИФН, показал снижение экспрессии данного вида рецепторов во всех исследуемых структурах головного мозга, при этом введение α -ИФН особенно значительно снижает экспрессию рецепторов к γ -ИФН во всех изученных участках головного мозга крыс. Такой результат может свидетельствовать о блокировке рецепторов к γ -ИФН при экзогенном введении α -ИФН. Указанные эффекты на рецепторы к гамма-интерферону не специфичны для интерферона-альфа, но учитывая пересечение и плейотропизм сигнальных путей [37, 38] при активации различных видов рецепторов, данный эффект вполне может наблюдаться при приложении α -ИФН.

В целом, анализ процента клеток, экспрессирующих рецепторы к интерферону, выявил значимое снижение экспрессии обоих видов рецепторов к интерферонам во всех областях головного мозга, кроме зафиксированного увеличения экспрессии к α -ИФН в энторинальной коре.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время установлено, что ИФН-терапия индуцирует нейровоспаление и есть несколько гипотез, описывающих механизмы, лежащие в основе этого процесса. Депрессия, вызванная α -ИФН, может быть связана с изменением индукции провоспалительных цитокинов, нарушением механизмов обратного захвата серотонина, взаимодействием с опиоидными рецепторами и изменением проницаемости гематоэнцефалического барьера. Согласно нашим результатам исследования, в этом также могут играть роль сигнальные пути, связанные с активацией рецепторов к альфа-интерферону.

В ходе данного исследования были полностью решены поставленные задачи:

1. Неврологический дефицит у крыс во всех группах не резко выражен, что свидетельствует об отсутствии «грубых» неврологических нарушений, однако приложение альфа-интерферона оказывает нейротоксический эффект, но в отношении принятия новой пищи (тест на гипонеофагию) отмечается потенциальный нейропротективный эффект.
2. Стрессогенность новизны (в тесте «открытое поле») и переменная стрессогенность (в тесте ПКЛ) более выражены у контрольных животных после введения α -ИФН; у животных, перенесших острый стресс в сочетании с 5-кратным введением интерферона, он оказывал в большинстве случаев нейротоксический эффект в виде усугубления признаков депрессии.
3. У контрольных животных и перенесших острый стресс 5-кратное введение α -ИФН вызывает развитие депрессия-подобного состояния, что в будущем можно будет использовать при создании новых вариантов моделей экспериментальной депрессии.
4. Анализ процента клеток, экспрессирующих рецепторы к интерферону, выявили соотносимые с результатами тестирований изменения: значимое снижение экспрессии обоих видов рецепторов к интерферону во всех областях головного мозга, кроме зафиксированного увеличения экспрессии к

α -ИФН в энторинальной коре, что связано с разными сроками реагирования на стресс различных отделов лимбической системы, а также плеiotропными эффектами приложения α -ИФН.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИФН – интерферон

ЦНС – центральная нервная система

ФНО α – фактор некроза опухоли- α

ИЛ – интерлейкин

ГГНС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система

ТРП – триптофан

КИН – кинуреин

ИДО – индоламин 2,3-диоксигеназа

ХК – хинолиевая кислота

КРГ – кортикотропин-рилизинг-гормон

ПДК – плазмоцитоидные дендритные клетки

ГГН – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось высвобождения

ГК – глутаминовая кислота

NSS – неврологическая шкала

ТГНФ – тест на гипонеофагию

ПКЛ – тест приподнятый крестообразный лабиринт

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Zheng L.S. Minocycline treatment ameliorates interferon-alpha- induced neurogenic defects and depression-like behaviors in mice / L.S. Zheng, N. Kaneko, K. Sawamoto // *Front Cell Neuroscience*. – 2015. – Vol. 9, № 5.
2. Stewart W.E. In: *The interferon system* / W.E Stewart // Springer-Verlag. – 1979.
3. Ших Е.В. Рекомбинантный интерферон альфа-2b с антиоксидантами (альфа токоферола ацетат и аскорбиновая кислота): эффективность с точки зрения взаимодействия компонентов / Е.В. Ших, М.Н. Дорофеева // *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. – 2015. – № 5.
4. Stanifer M.L. Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling / M.L. Stanifer, K. Pervolaraki, S. Boulant // *International journal of molecular sciences*. – 2019. - Vol. 20, № 6.
5. Donnelly R.P. Interferon-lambda: a new addition to an old family / R.P. Donnelly, S.V. Kotenko // *Interferon Cytokine*. – 2010. – Vol. 30, № 8.
6. Zhou J. Type III Interferons in Viral Infection and Antiviral Immunity / J. Zhou, Y. Wang, Q. Chang, P. Ma et al. // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2018. – Vol. 51, No 1.
7. Хмелевской В.И. Альфа-интерферон в клинической практике / В.И. Хмелевской, В.Я. Провоторов, В.В. Киселёва, О.А. Девянин // *Архивъ внутренней медицины*. – 2014. – №5(19).
8. Hoyo-Becerra C. Insights from interferon-a-related depression for the pathogenesis of depression associated with inflammation / C. Hoyo-Becerra, J.F. Schlaak, D.M. Hermann // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2014. – Vol. 42.
9. Hepgul N. Transcriptomics in Interferon- α -Treated Patients Identifies Inflammation-, Neuroplasticity- and Oxidative Stress-Related Signatures as Predictors and Correlates of Depression / N. Hepgul, A. Cattaneo, K. Agarwa, S. Baraldi et al. // *Neuropsychopharmacology*. – 2016. – Vol. 41. – P. 2502-2511.

10. Fischer C.W. Interferon-alpha treatment induces depression-like behaviour accompanied by elevated hippocampal quinolinic acid levels in rats / C.W. Fischer, A. Eskelunda, D. P. Budac, S. Tillmann et al. // Behavioural Brain Research. – 2015. – P. 166-172.
11. Шилов Ю.Е. Кинуренины в патогенезе эндогенных психических заболеваний / Ю.Е. Шилов, М.В. Безруков // Вестник РАМН. – 2013. – № 1.
12. Собенников В.С. Соматизация и психосоматические расстройства: монография / В.С. Собенников, Ф.И. Белялов. – Иркутск: РИО ИГИУВа, 2010. – 230 с.
13. Borsinia A. The role of circulatory systemic environment in predicting interferonalpha-induced depression: The neurogenic process as a potential mechanism / A. Borsinia, C.M. Pariantea, P.A. Zunszaina, N. Hergula et al. // Brain, Behavior, and Immunity. – 2019. – Vol. 81.
14. Black P.H. Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences / P.H. Black // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1994. – Vol. 38. – P. 1-6.
15. Zheng L.S. Mechanisms for Interferon-a-Induced Depression and Neural Stem Cell Dysfunction / L.S. Zheng, S. Hitoshi, N. Kaneko, K. Takao et al. // Stem Cell Reports. – 2014. – Vol. 3. – P. 73-84.
16. Прохоренко И.О. Стресс и состояние иммунной системы в норме и патологии. Краткий обзор литературы / И.О. Прохоренко, В.Н. Германова, О.С. Сергеев // Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье – 2017. – № 1.
17. Paul S. Type I interferon response in the central nervous system / S. Paul, C. Ricour, C. Sommereyns, F. Sorgeloos et al. // Biochimie. – 2007. – Vol. 89, №. 6. – P. 770-778.
18. Sorgeloos F. Antiviral type I and type III interferon responses in the central nervous system / F. Sorgeloos, M. Kreit, P. Hermant, C. Lardinois et al. // Viruses. – 2013. – Vol. 5, №. 3. – P. 834-857.

19. Абрамец И.И. Нейрохимические и нейрофизиологические механизмы депрессивного синдрома / И.И. Абрамец // Международный неврологический журнал. – 2012. – Т. 5, вып. 51. – С. 236-244.
20. Афтанас Л. Депрессия и нейродегенерация: новые стратегии диагностики и терапии / Л. Афтанас // Наука из первых рук. – 2017. – № 1. – С. 73.
21. Табеева Г.Р. Когнитивные и не когнитивные расстройства у пациентов пожилого возраста / Г.Р. Табеева // Нейрология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2015. – № 1. – С. 87-93.
22. Погосова Г.В. Нейропластичность мозга, ее связь с депрессией и приемом антидепрессантов / Г.В. Погосова, И.Е. Колтунов, Ю.М. Юферева, А.К. Аушева // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2009. – № 8. – С. 73-76.
23. Lupien S.J. Effects of stress throughout the lifespan on the brain / S.J. Lupien // Nature reviews. Neuroscience. – 2009. – Vol. 10, № 6. – P. 434-45.
24. Mora F. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration / F. Mora, G. Segovia, A. del Arco et all. // Brain research. – 2012. – Vol. 2. – P. 71-85.
25. Arlington V.A. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders / V.A. Arlington // American Psychiatric Publishing. – 2013. – P. 160-162.
26. Язуина Н.А. Современные экспериментальные модели депрессии / Н.А. Язуина, Ю.К. Комлева, А.Б. Салмина, М.М. Петрова и др. // Биомедицина. – 2013. – № 1. – С. 61-77.
27. Умрюхин А.Е. Нейромедиаторные гиппокампальные механизмы стрессорного поведения и реакций избегания / А.Е. Умрюхин // Вестник медицинских технологий. – 2013. – №1.
28. Кашапов Ф.Ф. Особенности биологии миндалевидного комплекса при тревоге и агрессивности / Ф.Ф. Кашапов // Эпоха науки. – 2017. – № 10.
29. Богомолова Н.В. Функциональная морфология клеток крови в условиях острого иммобилизационного стресса при облучении электромагнитными волнами миллиметрового диапазона / Н.В. Богомолова, В.Ф. Киричук, С.И. Киреев // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 6. – С. 43-44.

30. Красовский Г.Н. Проблема экстраполяции результатов биотестирования на человека / Г.Н. Красовский, Н.А. Егорова, М.Г. Антонова // Токсикологический вестник. – 2000. – № 6. – С.13-19.
31. Чайка А.В. Тест на гипонеофагию – метод определения анксиолитических веществ / А.В. Чайка, И.В. Черетаев, Д.Р. Хусаинов, И.И. Коренюк // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2015. – Т. 13, вып. 3. – С. 48-55.
32. Степанченко Н.С. Применение метода «Открытое поле» в токсикологических экспериментах [Электронный ресурс] / Н.С. Степанченко, А.В. Лесникова // IV Международная студенческая электронная научная конференция "Студенческий научный форум 2012". – 2012. – Режим доступа: <http://www.rae.ru/forum2012/pdf/1512.pdf> (дата обращения: 30.08.2018).
33. Леушкина Н.Ф. Характеристика поведения крыс, различающихся по генотипу локуса TAG 1A гена рецептора дофамина второго типа, в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» / Н.Ф. Леушкина, А.В. Ахмадеев, Л.Б. Калимуллина // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1. – С. 65-69.
34. Johnson J.D. Neuroendocrine Regulation of Brain Cytokines After Psychological Stress / J.D. Johnson, D.F. Barnard, A.C. Kulp, D.M. Mehta // Journal of Endocrine Society. – 2019. – Vol. 3, № 7. – P. 1302-1320.
35. Frank M. G Stress- and glucocorticoid-induced priming of neuroinflammatory responses: potential mechanisms of stress-induced vulnerability to drugs of abuse / M. G Frank, L. R. Watkins, S.F. Maier // Brain, behavior, and immunity. 2011. – Vol. 25. – P. 21-28.
36. Чиркова М.А. Морфологические изменения астроглии в гиппокампе и миндалине при анксиогенезе / М.А. Чиркова, К.Ю. Артёмова, Е.А. Буденкова, М.В. Сидорова и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 3.
37. Plataniias L.C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling / L.C. Plataniias // Nature reviews. Immunology. – Vol. 5. – P. 375-386.

38. Dussurget O. The bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* and the interferon family: type I, type II and type III interferons / O. Dussurget, H. Bierné, P. Cossart // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – Vol. 4.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Дизайн эксперимента



ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Создание модели острого иммобилизационного стресса



<http://psihdocs.ru/lekarstvennij-antistress-v-eksperimente/60729.html> 60a7b0eb.jpg

иммобилизация крыс в узких индивидуальных пеналах (резком ограничении двигательной активности) в течение 30-ти минут

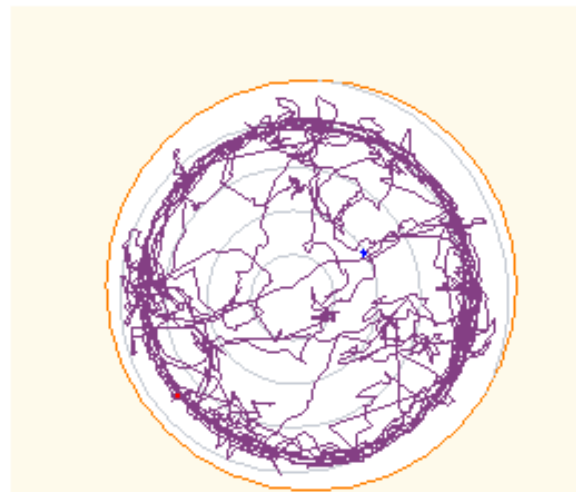
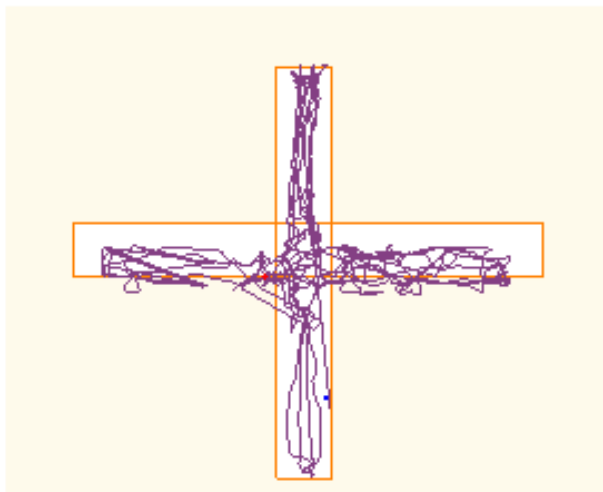


ПРИЛОЖЕНИЕ В. Протокол теста для оценки неврологического дефицита (NSS-тест)

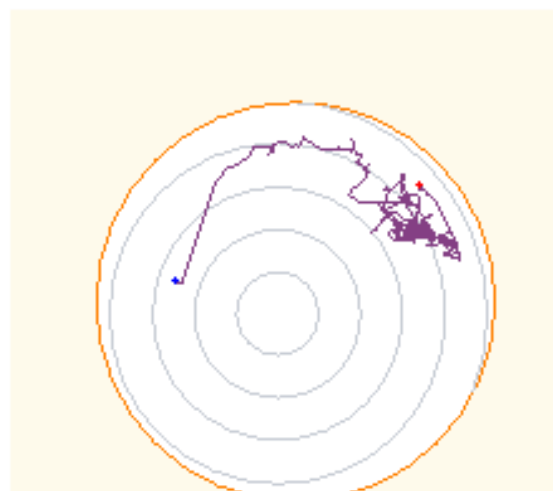
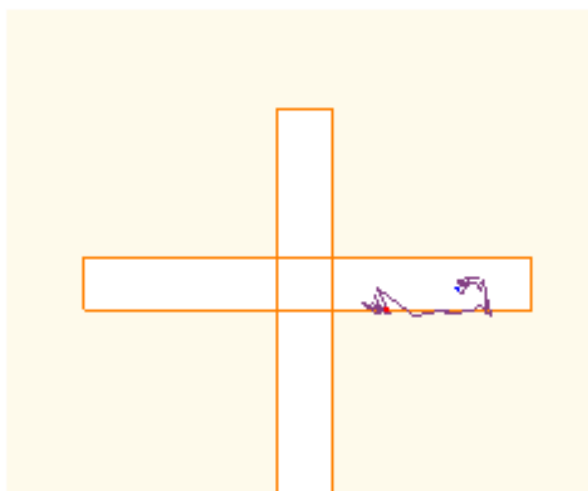
Протокол оценки (отметить или подчеркнуть баллы справа при тестировании)		М акс. число баллов
Оценка моторной функции		
Подвешивание крысы за хвост:	0	
1 – сгибание передней лапы	1	3
1 – сгибание задней лапы	2	
1 – отклонение головы более чем на 10 градусов от вертикальной оси в течение 30 сек	3	
Помещение крысы на пол:	0	
0 – нормальное движение по полу	1	3
1 – неспособность сохранять направленное движение	2	
2 – движение по кругу в сторону паретичных конечностей	3	
3 – падение на паретичную сторону		
Оценка сенсорной функции:		
1 – укладывание (зрительный и тактильный тесты)	0	2
1 – проприоцептивный тест (придавливание лапки к краю стола)	1	
	2	
Отсутствие рефлексов или патологическая двигательная активность		
1 – рефлекс с ушной раковины (при дотрагивании до слухового бугорка – тряска головой)	0 1	1
1 – роговичный рефлекс (при дотрагивании до роговицы кусочком ваты – мигание)	0 1	1
1 – рефлекс испуга (двигательный ответ на короткий шум при щелкании зажима для бумаги)	0 1	1
Оценка равновесия:		
0 – сохранение равновесия и стабильное положение тела		6
1 – захватывание балансира	0	
2 – крепкое сжатие балансира и отвисание одной паретичной конечности вдоль балансира	1	
3 – крепкое сжатие балансира и отвисание двух паретичных конечностей вдоль балансира, или кружение на балансире (более 60 сек)	2 3	
4 – попытка сохранить равновесие на балансире (более 40 сек), но падение с него	4 5	
5 – попытка сохранить равновесие на балансире (менее 40 сек), но падение с него	6	
6 – падение без попытки балансировать или ухватиться (менее 20 сек)		
1 – судороги, миоклонус, миодистония	0 1	1
Итоговое количество баллов		1 8

Примечание: один балл соответствует невозможности выполнять задание или отсутствие тестируемого рефлекса; 13-18 баллов – выраженное повреждение; 7-12 баллов – повреждение средней степени тяжести; 1-6 баллов – умеренное повреждение.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Примеры нормального и депрессия-подобного поведения в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт»



Пример нормального поведения в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» и «открытое поле»



Пример депрессия-подобного поведения в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» и «открытое поле»

ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Протокол проведения иммуногистоцитохимии для «свободно-плавающих» срезов

Окраска проводилась в 12-луночных планшетах, все этапы окраски и промывки проводились с использованием шейкера, для инкубации с антителами использовалось по 100 мкл Washing solution, для остальных этапов - по 200 мкл растворов.

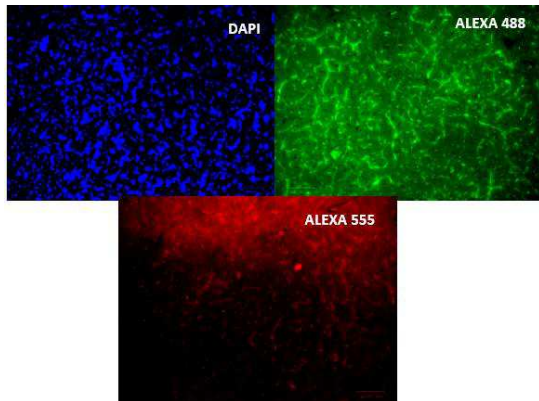
- 3-кратная промывка срезов по 5 минут в Washing solution.
- Блокирование неспецифического связывания Blocking solution (1 час при комнатной температуре).
- 3-кратная промывка срезов по 5 минут в Washing solution.
- Инкубация с первичными антителами в рабочем разведении от 1:500 до 1:10000 в АВ-solution при 4°C на ночь.
- Продолжение инкубации с первичными антителами 2 часа при комнатной температуре.
- 3-кратная промывка срезов по 5 минут в Washing solution.
- Инкубация с вторичными антителами 2 часа при комнатной температуре.
- 3-кратная промывка срезов по 5 минут в Washing solution.
- Перенос среза на предметное стекло.
- Нанесение на срез монтирующей жидкости (30-50 мкл глицерина в PBS 1:1+DAPI).
- Защита среза покровным стеклом.
- Микроскопия.

Используемые растворы:

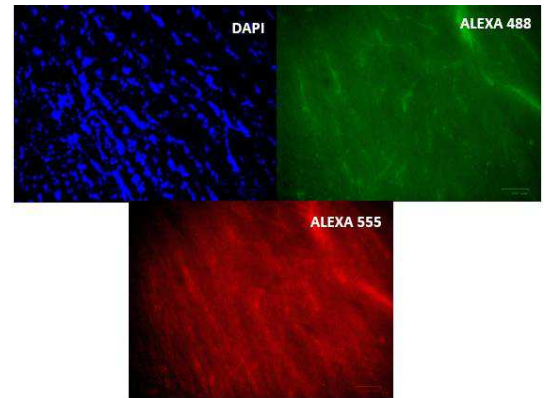
1. Washing solution: 0,2% Triton X-100 в PBS
2. Blocking solution: 1% Triton X-100 + 3% BSA в PBS
3. АВ-solution: 0,2% Triton X-100 + 3% BSA в PBS

ПРИЛОЖЕНИЕ Е. Фотографии флуоресцентной микроскопии рецепторов к интерферонам к интерферонам

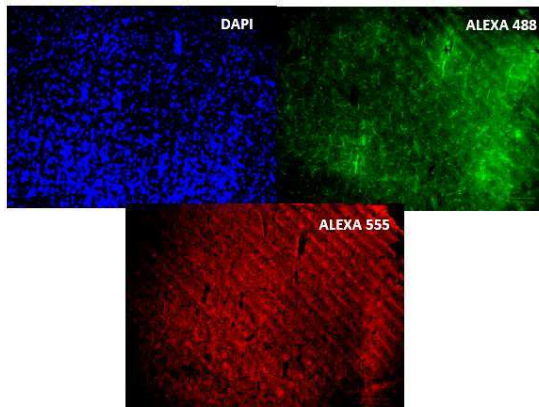
Фотографии флуоресцентной микроскопии рецепторов к интерферонам (зеленый цвет – рецепторы к альфа-интерферону, красный – рецепторы к гамма-интерферону) в ткани головного мозга при остром стрессе и в физиологических условиях на примере энторинальной коры



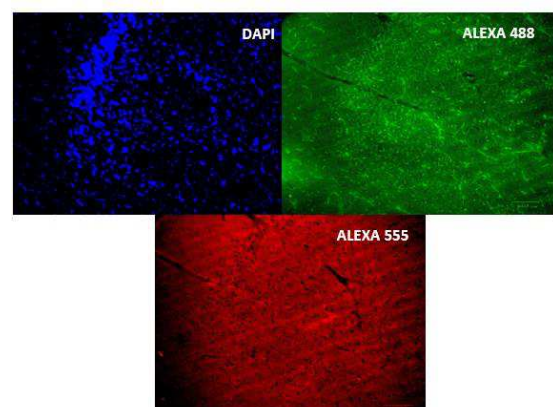
А. Мозг интактной крысы (x400)



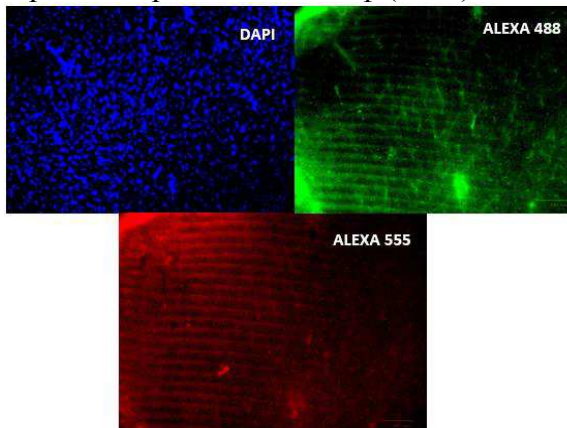
Б. Мозг крысы из контрольной группы с введением растворителя (x400)



В. Мозг крысы из контрольной группы при 5-кратном приложении α -иф (x400)



Г. Мозг крысы с моделью ОС и приложением растворителя (x400)



Д. Мозг крысы с моделью ОС при 5-кратном приложении α -иф (x400)

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж. Интерпретация диаграмм «ящик с усами»



Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В.А. Кратасюк /В.А. Кратасюк/
«22» июня 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Влияние альфа-интерферона на развитие депрессии у крыс при пятикратном
воздействии

Научный руководитель *Лопатина* 23.06.2020 д.б.н. О.Л. Лопатина
подпись, дата инициалы, фамилия

Научный консультант *Малиновская* 23.06.2020 д.м.н. Н.А. Малиновская
подпись, дата инициалы, фамилия

Выпускник ББ16-31 Б *Ушакова* 22.06.2020 О.А. Ушакова
подпись, дата инициалы, фамилия

Красноярск 2020