

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ В.А. Кратасюк

«_____» _____ 2021 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.02 – Биология

Особенности поведенческих реакций самок мышей, дефицитных по NLRP3

Руководитель _____
подпись, дата

проф., д.б.н. О. Л. Лопатина

Выпускник _____
подпись, дата

А. Е. Чалышева

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Особенности поведенческих реакций самок мышей, дефицитных по NLRP3» содержит 36 страниц текстового документа, 26 использованных источников, 13 листов графического материала.

ПОВЕДЕНИЕ, ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНОЕ РАССТРОЙСТВО, ДЕПРЕССИЯ, СОЦИАЛИЗАЦИЯ, NLRP3 ИНФЛАММАСОМА, ОКСИТОЦИН, ИММУНОГИСТОХИМИЯ, ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ.

Цель работы: изучить особенности фенотипа и возможность развития тревожно-депрессивных расстройств у самок NLRP3^{-/-} мышей.

Актуальность исследования обусловлена тем, что большое количество людей болеют различными психопатологиями и когнитивными нарушениями. На данный момент времени самыми распространенными психопатологиями считаются депрессия и тревожные расстройства. Мыши опытной группы исследования, которые дефицитны по гену NLRP3, имеют сниженную восприимчивость к возрастным заболеваниям. Мы рассматриваем модель NLRP3-дефицитных самок мышей с точки зрения потенциальной роли NLRP3 в развитии тревожно-депрессивных расстройств.

В результате исследования были выявлены нейроповеденческие особенности самок NLRP3^{-/-} мышей, а также особенности биохимического состава регионов головного мозга, плазмы крови и ликвора.

В итоге было обнаружено, что самки NLRP3^{-/-} мышей могут выступать моделью для изучения тревожно-депрессивных расстройств, сопровождающихся гиперактивностью.

СОДЕРЖАНИЕ

Актуальность	4
Цели и задачи	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Обзор литературы	7
1. Синтез окситоцина и активация окситоциновых рецепторов	7
2. Окситоцин и вазопрессин. Влияние на поведение	8
3. Типы введения окситоцина животным и людям	9
4. Мыши, дефицитные по NLRP3	10
Материалы и методы	12
Результаты	18
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	32
Выводы	33
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	34

Актуальность

Множество людей по всему миру страдают от психических патологий. Одни из самых распространённых из них – тревожные расстройства и депрессия, которые мешают современному человеку нормально функционировать в обществе.

Лабораторные животные являются неотъемлемой частью клинических исследований, в ходе которых познается базовое понимание поведенческих закономерностей и молекулярных патологий.

Ген *NLRP3* кодирует цитозольный белок криопирин, который является главным компонентом NLRP3-инфламмасом.

Мыши, дефицитные по гену *NLRP3*, имеют врожденные хронические заболевания, однако при этом имеют сниженную восприимчивость к возрастным заболеваниям, таким как болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз и т.д. У *NLRP3*-нокаутов выявлено усиленное отложение β -амилоида и сниженная активация каспазы-1 и интерлейкина-1 β .

Модель *NLRP3*-дефицитных мышей (*NLRP3*^{-/-}) интересна для исследования потенциальной роли *NLRP3* в развитии тревожно-депрессивных расстройств.

Исследование также уникально тем, что в нем принимают участие самки мышей данной линии, так как прежде подобных работ с ними не проводилось.

Цели и задачи

Цель работы: изучить особенности фенотипа и возможность развития тревожно-депрессивных расстройств у самок NLRP3^{-/-} мышей.

Задачи:

1. оценить тревожно-депрессивное поведение у самок NLRP3^{-/-} мышей;
2. оценить степень социализации и социальной памяти у самок NLRP3^{-/-} мышей;
3. оценить эмоциональный статус, депрессивно-подобное и мотивационное поведение у самок NLRP3^{-/-} мышей;
4. определить уровень окситоцина в гомогенатах тканей регионов головного мозга (гипоталамус, гиппокамп, миндалевидное тело), в плазме крови и ликворе у самок NLRP3^{-/-} мышей;
5. привести иммуногистохимический анализ в сагиттальных срезах мозга у самок NLRP3^{-/-} мышей.

ВВЕДЕНИЕ

Тревожно-депрессивное поведение, а также проблемы с социализацией часто являются последствиями нарушений работы нейропептидов окситоцина и вазопрессина в центральной нервной системе. Окситоцин и вазопрессин – нейропептиды, регулирующие уровень тревоги, страха, доверия, агрессии и стрессоустойчивости.

Нарушение баланса окситоцин-вазопрессиновой системы может приводить к различным патологиям, ассоциированным с нарушением поведенческих реакций и когнитивных функций. Таким образом, пониженный уровень окситоцина в организме может сопутствовать тревожным расстройствам, агрессии, депрессии, искаженному социальному поведению. Пониженный уровень вазопрессина отмечался у людей с агрессией, шизофренией и биполярным расстройством. Негативное влияние на центральную нервную систему имеет как недостаток, так и избыток данных гормонов.

Обзор литературы

1. Синтез окситоцина и активация окситоциновых рецепторов

Окситоцин (ОХТ) является полипептидом, который состоит из девяти аминокислот. Он был выделен и синтезирован в 1953 г.

Окситоцин производится и высвобождается гипоталамо-гипофизарной системой, которая находится в задней доле гипофиза и в медиальной части передней доли гипоталамуса. Система состоит из парных паравентрикулярных ядер и парных супраоптических ядер.

Аксоны нейронов идут через гипофизарную ножку в заднюю долю гипофиза, где накапливается в тельцах Геринга, после чего поступает через аксовазальные синапсы в кровеносные сосуды. Окситоцин, который находится в крови, оказывает периферическое действие на весь организм.

Рецептор окситоциновой группы (ОхуR) является 389-аминокислотным полипептидом. Химические сигналы воспринимаются рецепторами, которые при связывании специфических лигандов активируют внутриклеточную продукцию вторичных мессенджеров. Активация поверхностного рецептора приводит к изменениям внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Это приводит к дальнейшим изменениям, таким как: активация фермента, фосфорилирование белка и экспрессия генов.

У млекопитающих рецепторы окситоцина расположены в гладкомышечных клетках миометрия и в мембране клеток молочной железы. Также рецепторы окситоцина находятся в кровеносных сосудах, в сердце, в почечном эпителии, в некоторых областях коры и отделах ЦНС.

При выведении культур человеческих клеток окситоциновые рецепторы были найдены в остеобластах, на астроцитах, в клетках эпителиальной остеосаркомы, в клетках нейробластомы и аденокарциномы эндометрия. [16]

2. Окситоцин и вазопрессин. Влияние на поведение

Ген окситоцина располагается у разных видов млекопитающих на разных хромосомах. Таким образом, человеческая хромосома 20 располагает на себе ген окситоцина и ген вазопрессина, которые содержат в своих пределах по два интрона и по три экзона. Считывание этих полипептидов происходит отдельно и в разном направлении. Ген окситоцина у мышей находится на хромосоме 2.

Окситоцин (ОХТ) и аргинин-вазопрессин (AVP) играют ключевую роль эволюции регулирования сложного социального познания, физиологопсихологических и патофизиологических процессов млекопитающих, таких как:

- центральное воздействие: привязанность; социальное взаимодействие [13,14,21]; родительская опека [19]; распознавание «своих» и «чужих»; агрессия; стресс, тревога и депрессия [20,23], страх непознанного, страх смерти [7]; доверие [12]; специфическая картина секреции ОХТ и особенности поведенческих реакций; [11]
- периферическое воздействие: семяизвержение, сексуальная активность; беременность и сокращения матки, выброс молока; расстройства желудочно-кишечного тракта; остеопороз; диабет; рак; влияние на функционирование сердечно-сосудистой системы; модуляция боли.

ОХТ имеет важное значение для обработки или хранения прямой и косвенной социальной информации. [22]

Экспрессия обоих нейропептидов увеличивается во время и после родов, существенно изменяя поведение животного как к своему потомству (забота, защита у самок), так и к другим особям своего вида (агрессия у самцов). ОХТ и AVP, в межвидовом и внутривидовом случаях, имеют свои различия в действии на определенный организм. В некоторых исследованиях было показано, что более высокая секреция пролактина / окситоцина, а также более низкая секреция вазопрессина / андрогенов у кормящих матерей может защитить от послеродовой

депрессии и тревоги, снизить уровень раздражительности и оптимизировать стрессовые реакции. [10,25,26]

Многие исследования доказывают уникальность ОХТ и AVP и их рецепторов у каждого вида и каждого пола. [18] Некоторые виды демонстрируют социальное признание, связь между самкой и самцом и поиск своего потомства. Многие грызуны не моногамны, однако если самец и самка мышей вынуждены жить вместе в течение длительного времени в маленькой клетке, самец неизбежно будет найден в гнезде с потомством, обеспечивающим защиту и тепло. Этот процесс похож на процесс, называемый "сенитизацией". [17]

3. Типы введения окситоцина животным и людям

Типы введения окситоцина различны, благодаря разному воздействию на организм. Окситоцин и вазопрессин с трудом преодолевают ГЭБ, т.к. являются гидрофобными макромолекулами. На это могут влиять гипертония, стресс и другие заболевания. ОХТ имеет короткий период полураспада в крови, оцениваемый примерно между 3-9 минутами.

В исследованиях на животных обычно используют назальное, централизованное (непосредственное введение в головной мозг), внутривенное, внутриматочное и внутримышечное [3] типы введения окситоцина в организм.

Введение окситоцина в кору головного мозга лабораторных животных способствует изучению различных психических заболеваний.

Таким образом, исследования, проведенные с участием животных, согласуются как с периферической, так и с центральной ролью ОХТ; наиболее очевидным периферическим эффектом является облегчение сокращения гладкой мускулатуры. Центральная роль в большей степени является нейромодулятором в различных системах реагирования. Однако, как периферические, так и центральные механизмы зависят от стероидных гормонов.

В исследованиях, в которых участвуют люди, обычно применяются назальное, внутриматочное и внутримышечное типы введения окситоцина. Внутриматочное и внутримышечное применение окситоцина происходит в тех

случаях, когда есть необходимость в стимулировании сокращений матки. Это происходит либо при родах, когда есть вероятность гибели ребёнка при задержке в родовых путях, либо на ранних сроках беременности с целью аборта.

Внутривенное введение окситоцина является одним из самых известных, распространенных и испытанных методов родостимуляции. Мужчинам вводят окситоцин с целью нормализации сократительной функции семенных пузырьков. Иногда это внутривенные инъекции, но чаще всего используется назальное введение.

Также, нейропептид вводят назально для повышения либидо, улучшение эмоциональной составляющей половых отношений с партнёром.

4. Мыши, дефицитные по NLRP3

Живые модели, представленные разными генотипическими линиями мышей, широко используются для изучения поведенческих фенотипов, связанных с нейropsychическими расстройствами. Каждая линия мышей различаются по присущим им поведенческим и молекулярным характеристикам, что важно учитывать в исследовании. [9]

Белок NLRP3 является одной из самых изучаемых среди инфламмасом. Он принадлежит к семейству нуклеотидсвязывающих и олигомеризационных доменоподобных рецепторов (NLRs) и также известен как “пирен доменсодержащий белок 3”. Инфламмасома NLRP3 ассоциируется с началом и прогрессированием различных заболеваний, включая метаболические нарушения, рассеянный склероз, воспалительные заболевания кишечника, криопирин-ассоциированный синдром периодической лихорадки, а также другие аутоиммунные и аутовоспалительные заболевания. В дополнение к белку NLRP3 инфламмасома NLRP3 также содержит адаптерный белок, ассоциированный с апоптозом спекл-подобный белок (ASC) и прокаспазу-1. Взаимодействия между этими тремя белками тесно регулируют функцию инфламмасы, чтобы обеспечить иммунную активность только тогда, когда это необходимо.

Активация инфламмасом семейства NLRP происходит через каспаза-1-сигнальный путь. В активации участвуют главным образом β -амилоид, внеклеточный АТФ, а также кристаллы уратов и холестерина. Таким способом происходит инициация продукции первичных воспалительных цитокинов. [2]

Мыши, дефицитные по гену NLRP3, несут в себе мутации, связанные с сниженной восприимчивостью к возрастным заболеваниям, таким как болезнь Альцгеймера и другое. При отсутствии внутриклеточных рецепторов NLRP3 наблюдается снижение чувствительности к внеклеточным патогенным агентам. Исходя из этого было выявлено, что у NLRP3-дефицитных мышей присутствует в организме снижение активации CASP1 и IL-1 β , а также усиление отложения β -амилоида. Это делает мышей, нокаутированных по гену NLRP3, интересной моделью для исследования многих психологических и когнитивных нарушений.

Исследований с участием самок в разы меньше, чем с участием самцов. Однако, при исследовании различий в поведении между самками и самцами, самки проявляли тенденцию к снижению уровню тревожности, к увеличению уровня активности в нейроповеденческих тестах, а также к лучшим показателям болевой памяти во время контекста. Одной из причин различий особенностей поведения между самцами и самками могут быть гормональные изменения, которые способствуют в свою очередь нейронным изменениям в стрессовой реакции.

Кортиколимбическая система имеет прямое отношение к реакциям на стресс, страх и тревогу. Система состоит из миндалевидного тела, префронтальной коры и гиппокампа, опосредует эмоциональную реактивность при стрессе. [4] При проведении биохимического анализа было выявлено, что хронический стресс может физиологически влиять на оба пола сходным образом. [5] Иные исследования в области молекулярной нейробиологии показали, что экспрессия определенных белков в многих отделах кортиколимбической системы у самок повышена, в сравнении с экспрессией у самцов. [8]

Материалы и методы

1. Объект исследования:

Контрольная группа – мыши линии C57BL/6, самки в возрасте 3 месяцев (n=6). Опытная группа – NLRP3-дефицитные животные (линия B6.129S6-Nlrp3tm1Bhk/JJ), самки в возрасте 3 месяцев (n=6);

Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках (SEALSAFE IVC, S=435 см².) со свободным доступом к воде и корму при постоянной температуре 21±1°C и регулярном световом цикле 12 ч день/12 ч ночь.

Соответствие нормам законодательства. Исследования на животных проводятся в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/EC).

2. Нейроповеденческое тестирование:

С помощью батареи тестов были исследованы уровень тревожности и уровень социальной адаптации самок мышей двух разных генотипов. Использовались следующие протоколы: тест «черно-белая камера», тест «открытое поле», трехкамерный социальный тест, тест приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ), социальный пятипопыточный тест, тест «принудительное плавание» и тест «подвешивание за хвост».

2.1 Тест «открытое поле»

Данный тест используется чтобы оценить уровень тревожности, уровень исследовательской активности и уровень социальной адаптации тестируемых животных. Площадка для тестирования представляет собой круглую арену (63х63 см) серого цвета, разделённую на три кольцевые зоны: центр, средняя зона, периферическая (внешняя) зона.

Первая стадия теста оценивает тревожность и исследовательскую активность. Животное помещают в центр поля и регистрируют (ANY-maze soft)

его активность в течении 10 мин. Здесь наблюдается освоение новой среды лабораторным животным.

Во второй стадии в центр поля помещают неодушевленный объект – пустая клетка. Оценивают интерес к новому несоциальному объекту.

В третьей стадии в центр поля помещают социальный объект – клетка с ранее незнакомой самкой мыши (CD1). Оценивают уровень социализации.

Каждая стадия длится по 10 минут. Регистрируемые параметры: время нахождения в каждой из зон, количество посещений каждой из зон, пройденная дистанция в каждой из зон, время пребывания в зонах, время движения по направлению к центру интересующей зоны. Во второй и третьей стадиях измеряется также время пребывания у объекта.

2.2 Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ)

Тест используют для оценки уровня тревожности тестируемых животных.

Лабиринт состоит из четырех перпендикулярно расположенных рукавов, два открытых и два закрытых, находящихся на высоте 1 метр. Тест длится 10 минут. В ходе теста регистрируют: пройденная дистанция; посещения закрытых и открытых рукавов; время, проведенное в закрытых и открытых рукавах.

2.3 Тест «черно-белая камера»

Тест проводят для определения уровня депрессивно-подобного поведения и уровня тревожности у тестируемых животных. Лабиринт состоит из светлой и тёмной камер, которые между собой разделены перегородкой с небольшим проходом. Продолжительность теста 10 минут. В ходе теста регистрируют: первое время захода в тёмную камеру; количество выходов из тёмной камеры; количество выглядываний из тёмной камеры; время, проведенное в тёмной и светлой камерах.

2.4 Трехкамерный социальный тест

Тест проводят для определения уровня тревожности, уровня исследовательской активности и уровня социальной адаптации тестируемых животных, подобно тесту «открытое поле». Площадка для тестирования представляет собой три отсека, центральный и два боковых.

Первая стадия теста оценивает тревожность и исследовательскую активность.

Вторая и третья стадия оценивают проявление социальной адаптации. Во второй стадии в боковых отсеках располагают несоциальные объекты – по одной пустой клетке на отсек. *В третьей стадии* в правом отсеке помещают социальный объект – в пустую клетку помещают ранее незнакомую самку мыши (CD1).

Каждая стадия длится по 10 минут. В каждой стадии регистрируют: время пребывания в каждой из зон, количество посещений каждой из зон, пройденная дистанция в каждой из зон, время пребывания в зонах. В третьей стадии измеряют время пребывания у социального объекта.

2.5 Социальный пятипопыточный тест

Тест проводят для исследования уровня способности к социальному распознаванию и запоминанию. Площадка для тестирования представляет собой стандартную малую клетку для лабораторных животных, без подстила.

Тестирование проходит в 5 сессий. Продолжительность сессии 1 минута, продолжительность интервала между сессиями 3 минуты. С 1 по 4 сессию тестируемых животных подсаживают в подготовленные площадки, в которых находятся одни и те же самки мыши-резиденты, по 1 на 1 тестируемое животное. В пятую сессию происходит замена самок мышей-резидентов и к тестируемым животным подсаживаю ранее неизвестную самку мыши. В ходе теста регистрируют время проявления социального интереса тестируемого животного к самке мыши-резиденту (время следования «голова-хвост»).

2.6 Тест подвешивание за хвост

Тест оценивает уровень тревожности и депрессивно-подобного поведения у тестируемых животных. Площадка для тестирования представляет камеру с поддоном, прикрепленную к металлическому столу. Тестирование проходит 7 минут. Тестирование осуществляется подвешиванием мыши за хвост к держателю в индивидуальной камере. В ходе теста регистрируют: время до первого полного бездействия, время бездействия с 2 по 6 минуты.

2.7 Тест принудительное плавание

Тест оценивает уровень тревожности и депрессивно-подобного и мотивационного поведения у тестируемых животных. Площадка для тестирования представляет собой емкость с водой с глубиной, при которой мышь не может достать дна. Тестирование проходит 7 минут. Тестирование осуществляется погружением мыши в центр емкости. Температура воды составляет 23°C. В ходе теста регистрируют: время до первого полного бездействия, время бездействия с 2 по 6 минуты.

3. Биохимический анализ:

3.1 Иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA)

С помощью ИФА определяли содержание ОХТ в гомогенатах тканей различных регионов головного мозга, плазме крови и спинномозговой жидкости.

Анализ проводили по протоколу производителя: готовили стандарты разных концентраций и помещают их в планшет, 5 лунок по 50 мкл. В остальные лунки помещали исследуемые образцы по 50 мкл. Во все лунки добавляли по 50 мкл детектирующего реагента А. Планшет заклеивали плёнкой и инкубировали 1 час при температуре 37°C. После инкубации из планшета удаляли жидкость, а сам планшет промывали несколько раз и хорошо сушили. Далее добавляли по 100 мкл детектирующего реагента В в каждую лунку и инкубировали 30 минут при температуре 37°C. После инкубации из планшета удаляли жидкость и

промывали планшет несколько раз, после чего хорошо сушили. Далее добавляли по 90 мкл субстрата в каждую лунку, планшет заклеивали плёнкой и инкубировали 10-20 минут при температуре 37°C. Далее добавляли в каждую лунку по 50 мкл стоп-реагента, после чего планшет помещали в ИФА-ридер и снимали показания при длине волны 450 нм на микропланшетный фотометре Anthos 2010.

Количество ОХТ в каждой пробе рассчитывали по калибровочной кривой. Данные по регионам головного мозга представляли в пересчете на количество белка.

3.2 Анализ белков в тканях головного мозга.

Анализ проводился по протоколу: в эппендорфах готовили растворы гомогенатов по 200 мкл. Разведение 10х. Брали 20 мкл ткани региона головного мозга и 180 мкл дистиллированной воды. Тщательно перемешивали раствор и добавляли 50 мкл красителя Bio-RAD protein. В лунки планшета вносили по 200 мкл растворов гомогенатов, после чего планшет помещали в ИФА-ридер и снимали показания при длине волны 595 нм на микропланшетный фотометре Anthos 2010.

4. Иммуногистохимический анализ (ИГХ)

Данный анализ проводился с целью определить наличие окситоцинергических нейронов в различных регионах головного мозга.

Анализ проводился по протоколу: проведение окрашивания срезов головного мозга проводилось в два дня. Все этапы окраски и промывки проводились в 12-луночных планшетах и с использованием шейкера.

В первый день срезы мозга аккуратно переносят из 4% раствора PFA в ранее приготовленный промывающий раствор, в котором проводят пятикратную промывку срезов по 10-15 минут. После этого срезы мозга переносят в блокирующий раствор, где производят блокирование неспецифического связывания инкубацией на 1 час при температуре 37°C. Далее следует повторная

пятикратная промывка срезов по 10-15 минут. Потом срезы мозга переносят в чистые лунки планшета и осуществляют инкубацию с первичными антителами в рабочем растворе в холодильник при температуре 4°C на 12 часов.

Во второй день планшет с рабочим раствором и первичным антителами помещают на инкубацию на 2 часа при температуре 37°C. После этого проводят пятикратную промывку срезов по 10-15 минут. Далее срезы головного мозга помещают в раствор с вторичными антителами и инкубируют 2 часа при температуре 37°C. После этого проводят пятикратную промывку срезов по 10-15 минут. После всех проведенных процедур срезы мозга аккуратно перекалывают на предметные стёкла, где сверху наносят монтирующий раствор из 30-50 мкл глицерина в PBS 1:1, а потом добавляют краситель DAPI для окраски ядер нейронов. Сверху кладут покровные стёкла. Далее проводят микроскопию сагиттальных срезов головного мозга.

Оборудование: Флуоресцентный микроскоп ZOE™; Увеличение микроскопа 20x;

Используемые первичные антитела:

- 1) антитела поликлональные куриные к NeuN: ab 150074 500 µg (2 mg/ml)
- 2) антитела поликлональные кроличьи к окситоцину (производитель – Япония, предоставлены партнерской лабораторией Университета г. Канадзава)

Используемые вторичные антитела:

- 1) Dnk pAb to Rb IgG (Alexa Fluor® 555) Lot: GR3241278-1
- 2) Goat pAb to Chc IgY (Alexa Fluor® 647) Lot: GR233196-4.

5. Статистический анализ:

Полученные экспериментальные данные обрабатывались с помощью статистической программы GraphPad Prism 8, методами непараметрической статистики. Для сравнения показателей в независимых выборках применялся критерий Манна-Уитни. Различия принимали значимыми при $p \leq 0,05$. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего, p – уровень значимости.

Результаты

1. Результаты нейроповеденческого тестирования

При оценке тревожно-депрессивного поведения в тесте «черно-белая камера» не было выявлено статистически значимых отличий у NLRP3^{-/-} животных и животных контрольной группы. (Рисунок 1)

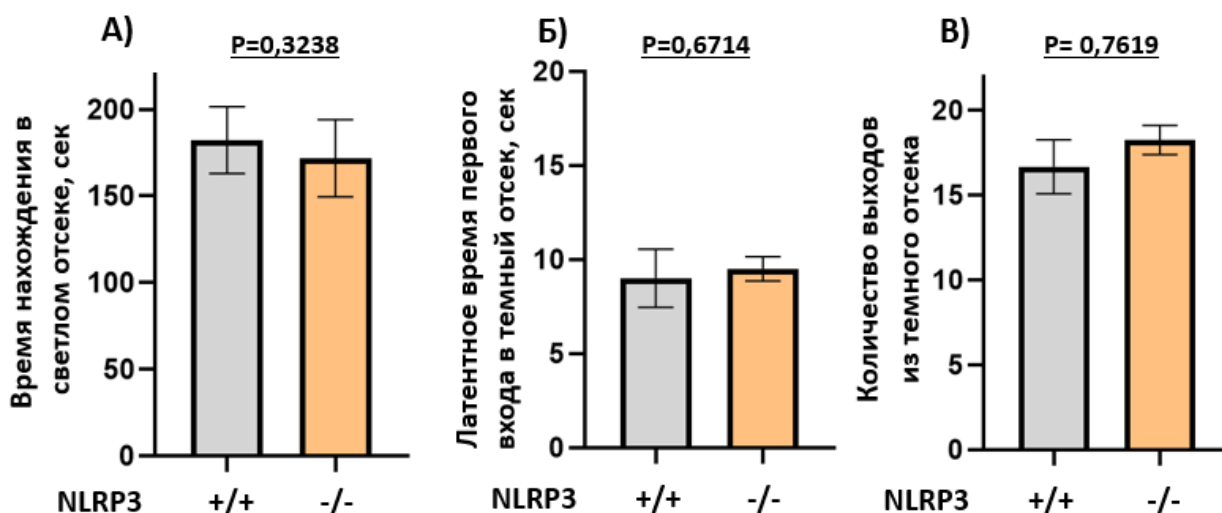


Рисунок 1. Оценка тревожно-депрессивного поведения в тесте «черно-белая камера».

А) Время нахождения в светлом отсеке, сек; Б) Латентное время первого входа в темный отсек, сек; В) Количество выходов из темного отсека. Данные проставлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего $M \pm SE$. U-критерий Манна-Уитни.

При оценке тревожно-депрессивного поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» NLRP3^{-/-} животные статистически значимо ($p \leq 0,05$) меньше времени проводили в закрытых рукавах по сравнению с контрольной группой, что указывало на отсутствие боязни высоты у NLRP3^{-/-} животных (Рисунок 2Г). При этом у NLRP3^{-/-} животных было выявлено статистически значимое повышение двигательной активности по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$) (Рисунок 2А). Однако NLRP3^{-/-} животные чаще входили в закрытые рукава, но находились там недолго, а также в целом были более беспокойны. (Рисунок 2Б, 2В).

Это свидетельствует о повышенной тревожности, общей повышенной подвижности и активности NLRP3^{-/-} животных. (Рисунок 2)

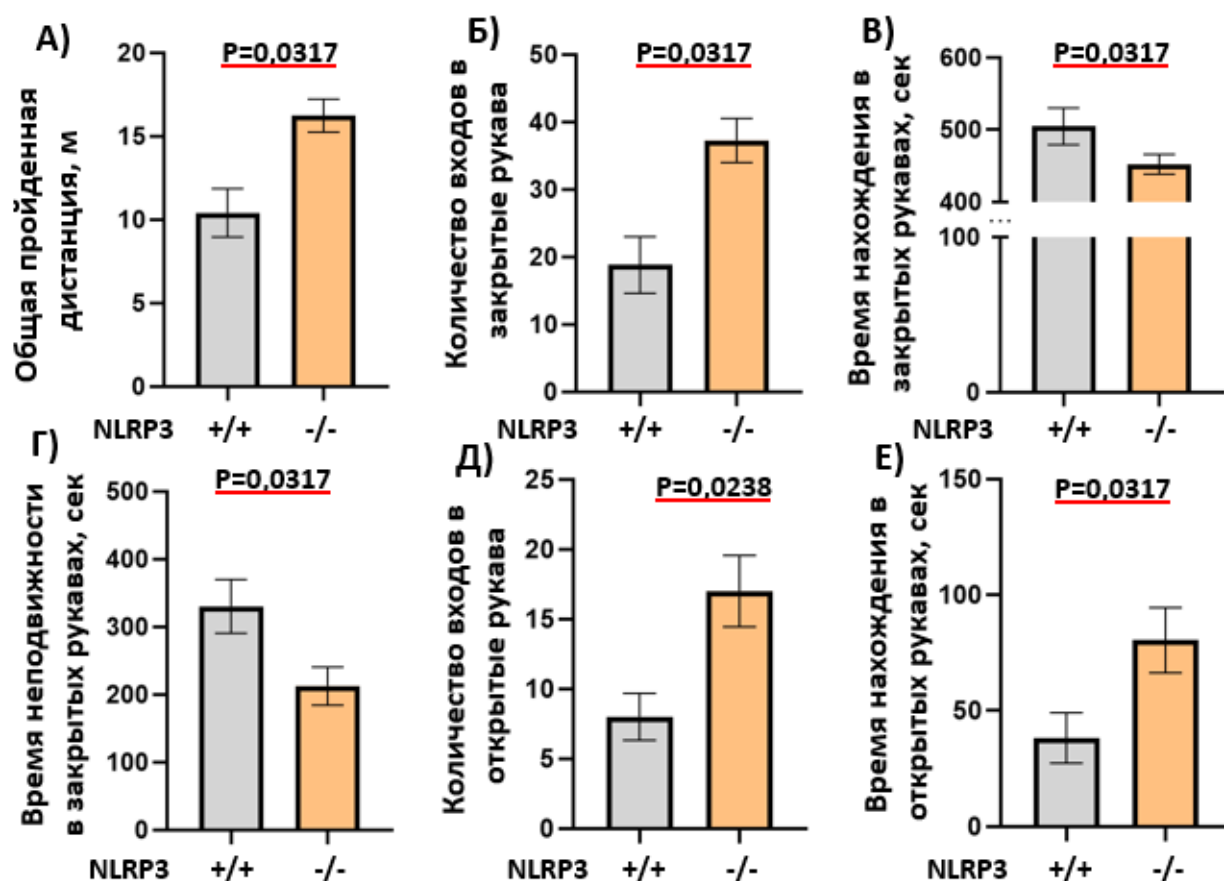


Рисунок 2. Оценка тревожно-депрессивного поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». А) Общая пройденная дистанция, м; Б) Количество входов в закрытые рукава; В) Время нахождения в закрытых рукавах, сек; Г) Время неподвижности в закрытых рукавах, сек; Д) Количество входов в открытые рукава; Е) Время нахождения в открытых рукавах, сек. Данные проставлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего $M \pm SE$. U-критерий Манна-Уитни.

При оценке депрессивно-подобного поведения в тесте «открытое поле» на первом этапе тестирования отмечено, что у $NLRP3^{-/-}$ животных статистически значимо ($p \leq 0,001$) было снижено движение по направлению к центру (Рисунок 3Г), а также имелось предпочтение проводить больше времени в наружной части поля по сравнению с животными контрольной группы (Рисунок 3Б). В целом у $NLRP3^{-/-}$ животных была выявлена повышенная активность ($p \leq 0,05$), что означает, что они были более беспокойны (Рисунок 3Д).

Это свидетельствует о проявлении повышенной тревожности и активности в группе $NLRP3^{-/-}$ животных. (Рисунок 3)

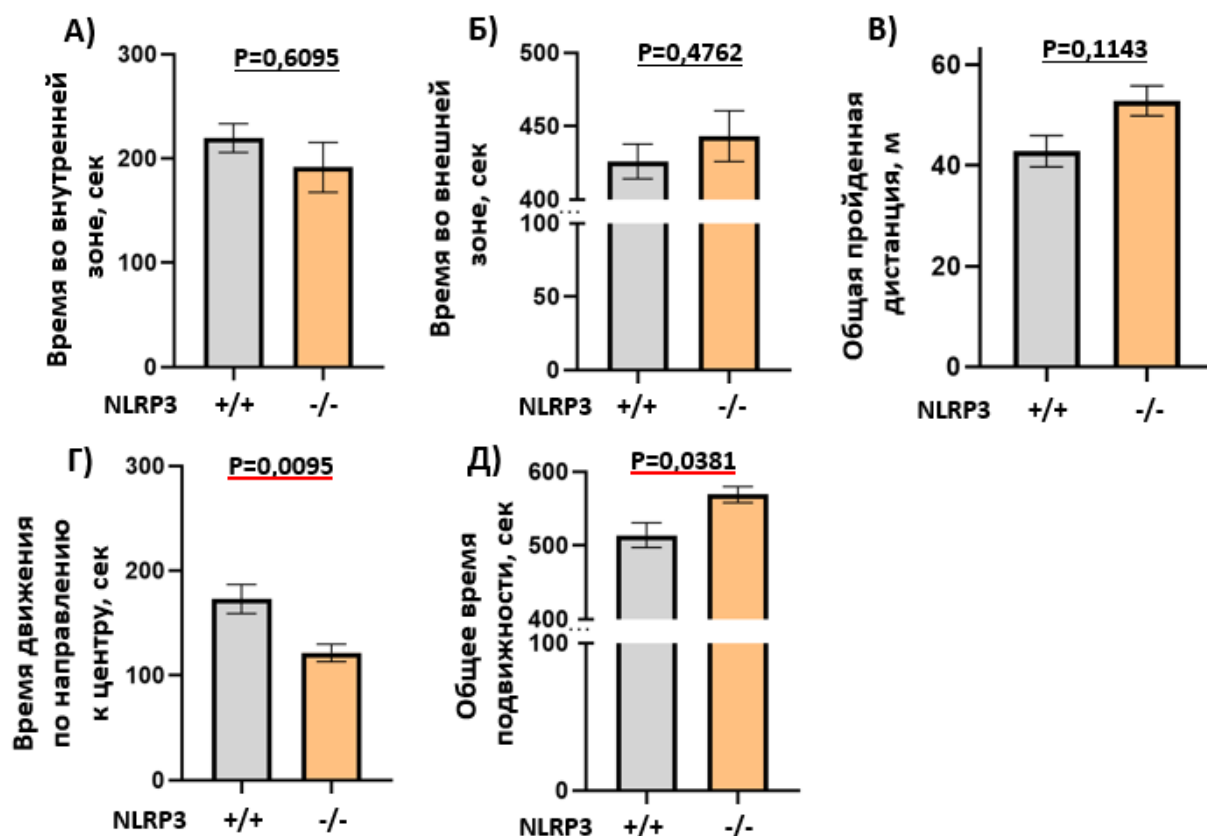


Рисунок 3. Оценка депрессивно-подобного поведения в тесте «открытое поле» (этап 1). А) Время во внутренней зоне, сек; Б) Время во внешней зоне, сек; В) Общая пройденная дистанция, м; Г) Время движения по направлению к центру, сек; Д) Общее время подвижности, сек. Данные проставлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего $M \pm SE$. U-критерий Манна-Уитни.

При оценке тревожного состояния при распознавании неодушевленного объекта в тесте «открытое поле» было выявлено, что $NLRP3^{-/-}$ животные статистически значимо ($p \leq 0,05$) меньше проводили времени в центре поля при появлении несоциального объекта (Рисунок 4Г), а также соответственно с этим проводили статистически значимо ($p \leq 0,05$) больше времени на периферии по сравнению с контрольной группой (Рисунок 4А). В целом $NLRP3^{-/-}$ животные были более беспокойны.

Это указывает на проявление тревоги у $NLRP3^{-/-}$ животных при появлении несоциального объекта. (Рисунок 4)

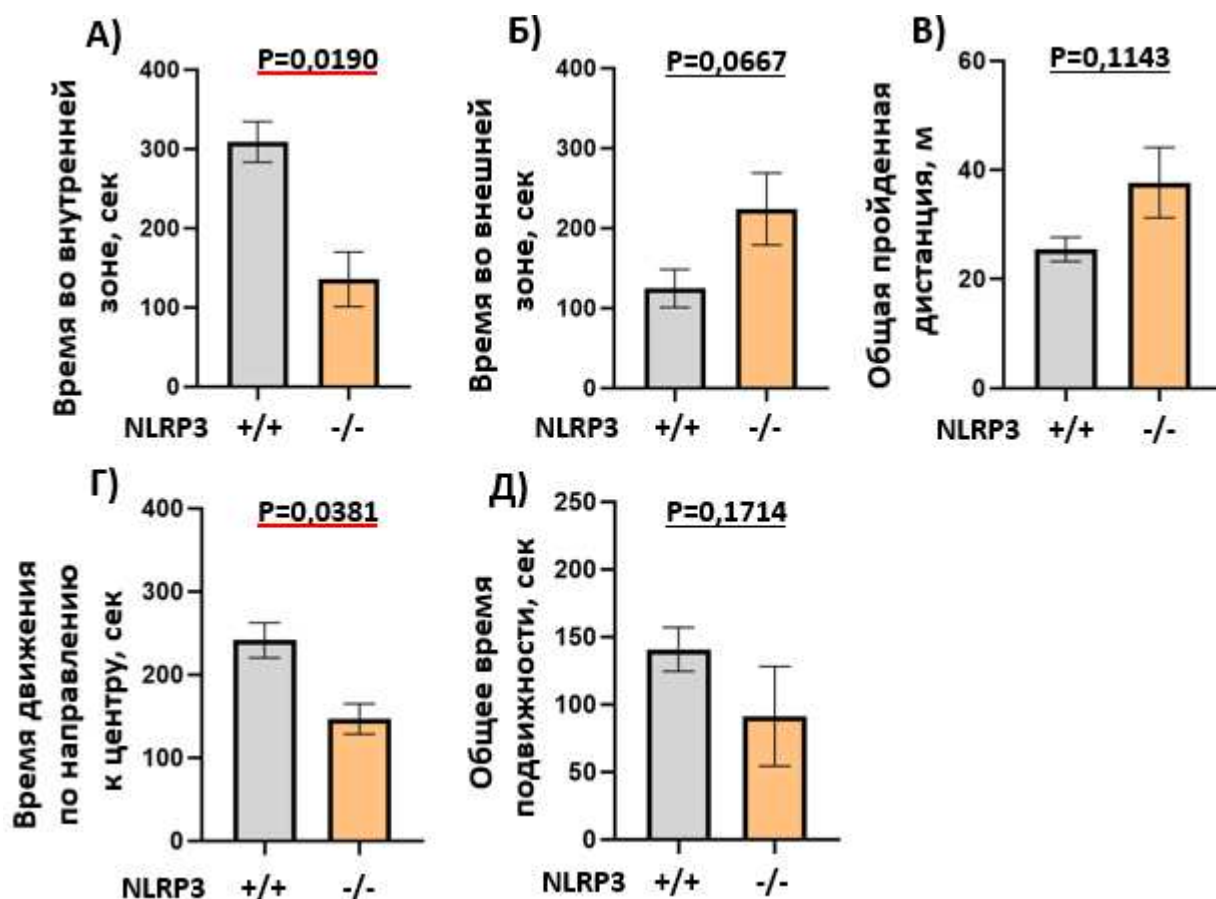


Рисунок 4. Оценка тревожного состояния при распознавании неодушевленного объекта в тесте «открытое поле» (этап 2). А) Время во внутренней зоне, сек; Б) Время во внешней зоне, сек; В) Общая пройденная дистанция, м; Г) Время движения по направлению к центру, сек; Д) Общее время подвижности, сек. Данные проставлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего $M \pm SE$. U-критерий Манна-Уитни.

При оценке уровня социализации в тесте «открытое поле» на третьем этапе тестирования $NLRP3^{-/-}$ животные показали статистически значимое различие ($p \leq 0,05$) по времени проведения в центре поля при появлении социального объекта (Рисунок 5А).

Это свидетельствует о том, что $NLRP3^{-/-}$ животные имеют пониженный уровень социализации. (Рисунок 5)

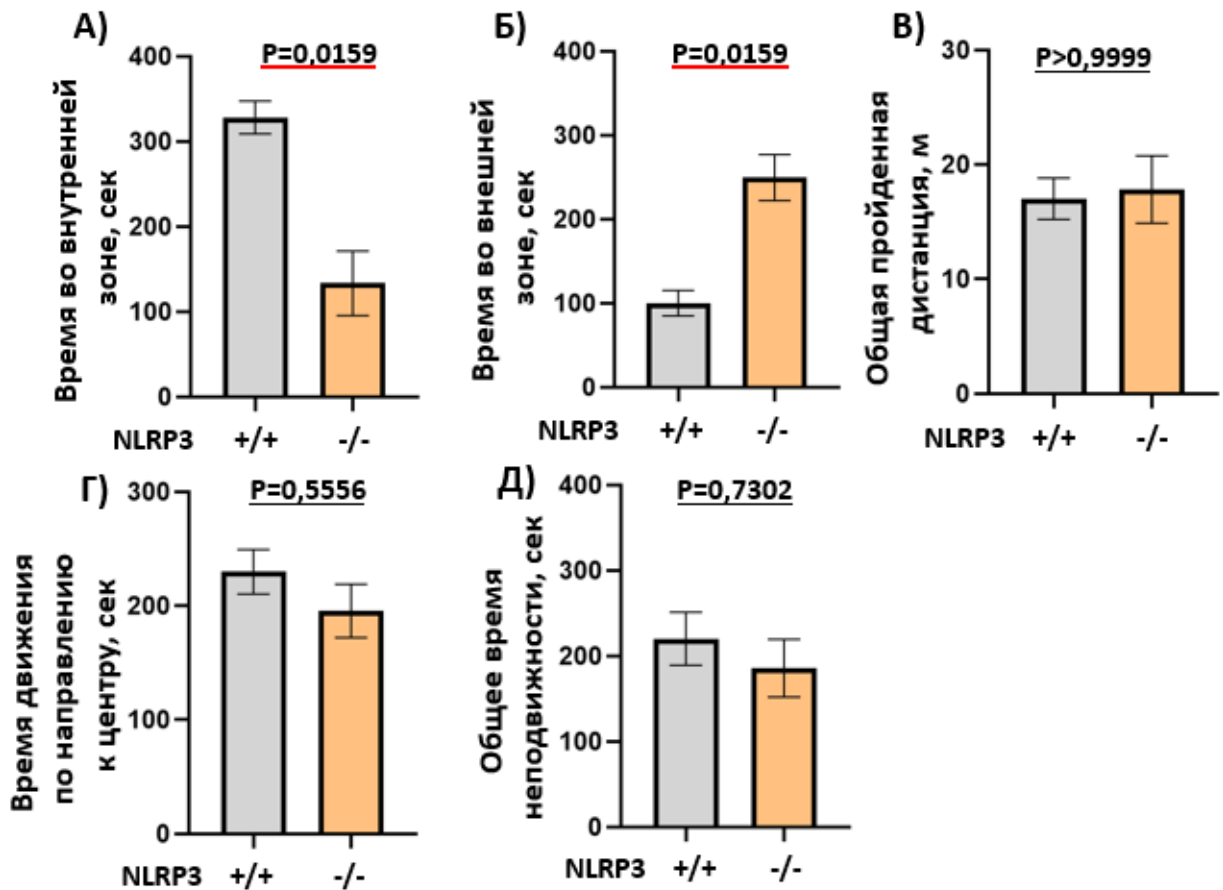


Рисунок 5. Оценка уровня социализации в тесте «открытое поле» (этап 3). А) Время во внутренней зоне, сек; Б) Время во внешней зоне, сек; В) Общая пройденная дистанция, м; Г) Время движения по направлению к центру, сек; Д) Общее время подвижности, сек. Данные проставлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего $M \pm SE$. U-критерий Манна-Уитни.

При оценке депрессивно-подобного поведения в «трехкамерном социальном тесте» (этап 1) было установлено, что у $NLRP3^{-/-}$ животных не наблюдалось статистически значимого предпочтения относительно отсеков. (Рисунок 6)

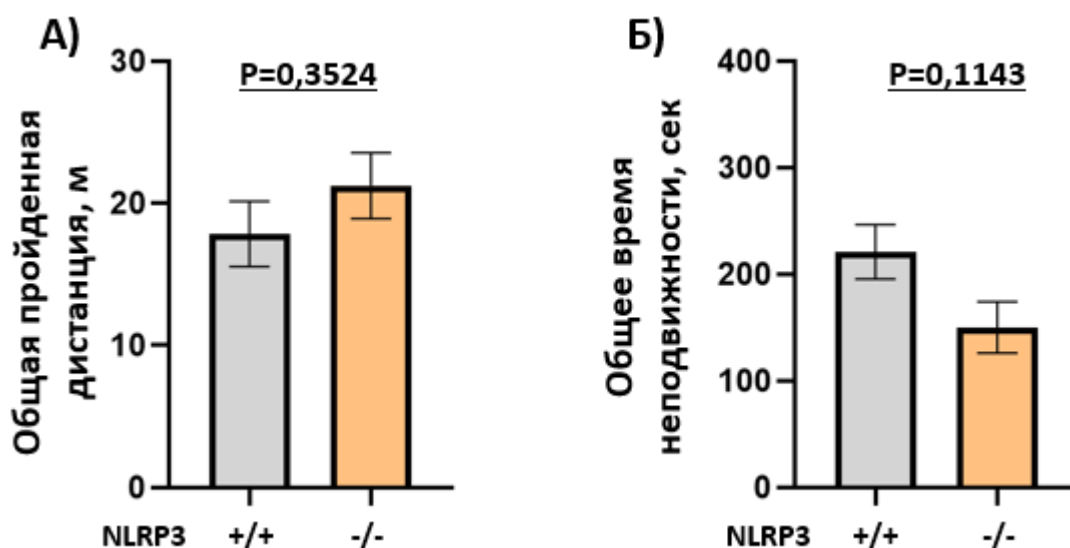


Рисунок 6. Оценка депрессивно-подобного поведения в «трехкамерном социальном тесте» (этап 1). А) Общая пройденная дистанция, м; Б) Общее время неподвижности, сек.

Данные проставлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего $M \pm SE$. U-критерий Манна-Уитни.

При оценке уровня социализации в «трехкамерном социальном тесте» на втором этапе $NLRP3^{-/-}$ животные статистически значимо ($p \leq 0,001$) больше времени проводили в левой, чем в правой камере (Рисунок 7Б). Также, $NLRP3^{-/-}$ животные статистически значимо ($p \leq 0,001$) меньше времени проводили в зоне с социальным объектом по сравнению с животными контрольной группы (Рисунок 7Д).

Это указывает на то, что $NLRP3^{-/-}$ животные имеют пониженный уровень социализации. При этом $NLRP3^{-/-}$ животные предпочитают проводить время в среднем отсеке, что означает повышенный уровень тревожности и беспокойства. (Рисунок 7)

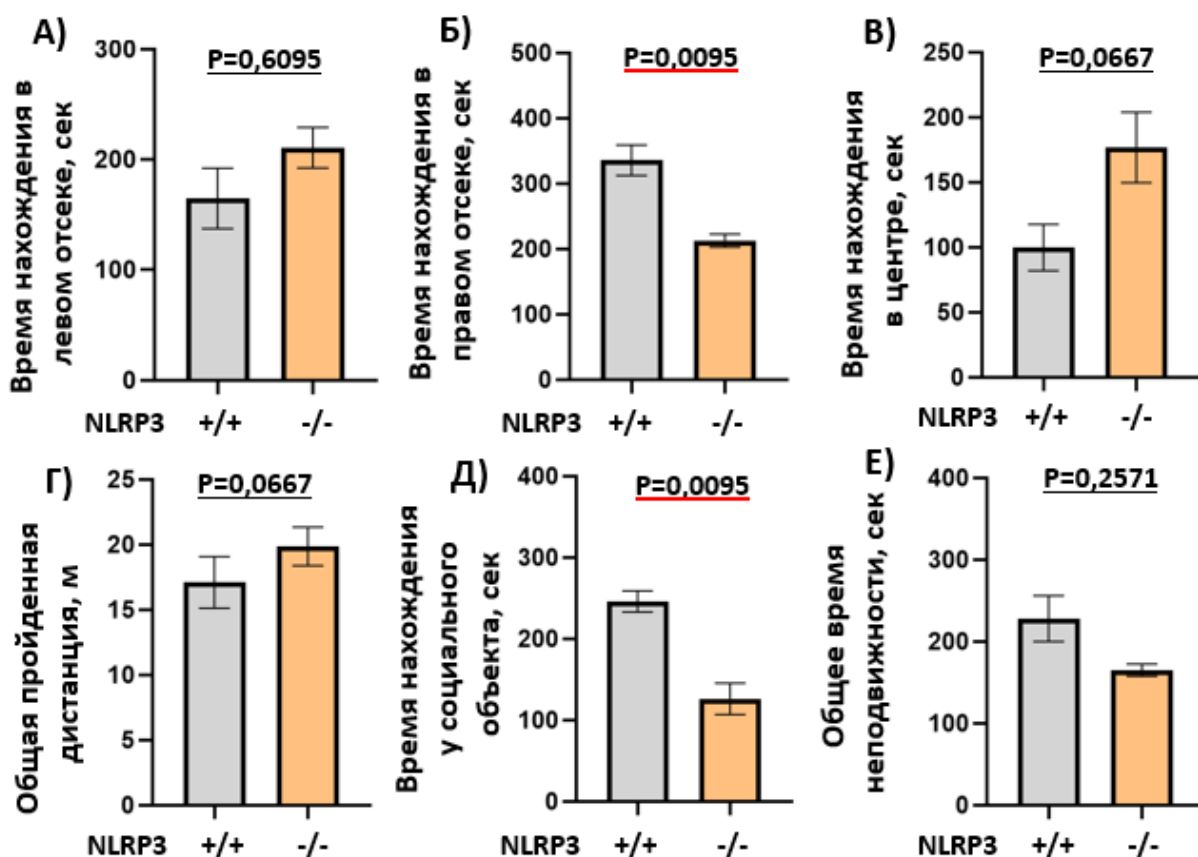


Рисунок 7. Оценка уровня социализации в «трехкамерном социальном тесте» (этап 2).

А) Время нахождения в левом отсеке, сек; Б) Время нахождения в правом отсеке, сек; В) Время нахождения в центре, сек; Г) Общая пройденная дистанция, м; Д) Время нахождения у социального объекта, сек; Е) Общее время неподвижности, сек. Данные проставлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего $M \pm SE$. U-критерий Манна-Уитни.

При оценке социальной памяти в «пятипопыточном тесте» не было выявлено статистически значимых отличий у $NLRP3^{-/-}$ животных и животных контрольной группы.

Это свидетельствует о том, что самки мышей линии C57BL/6 и $NLRP3^{-/-}$ животных не отвечают в данном тесте. Это является особенностью линии. Согласуется с данными партнерской лаборатории. (Рисунок 8)

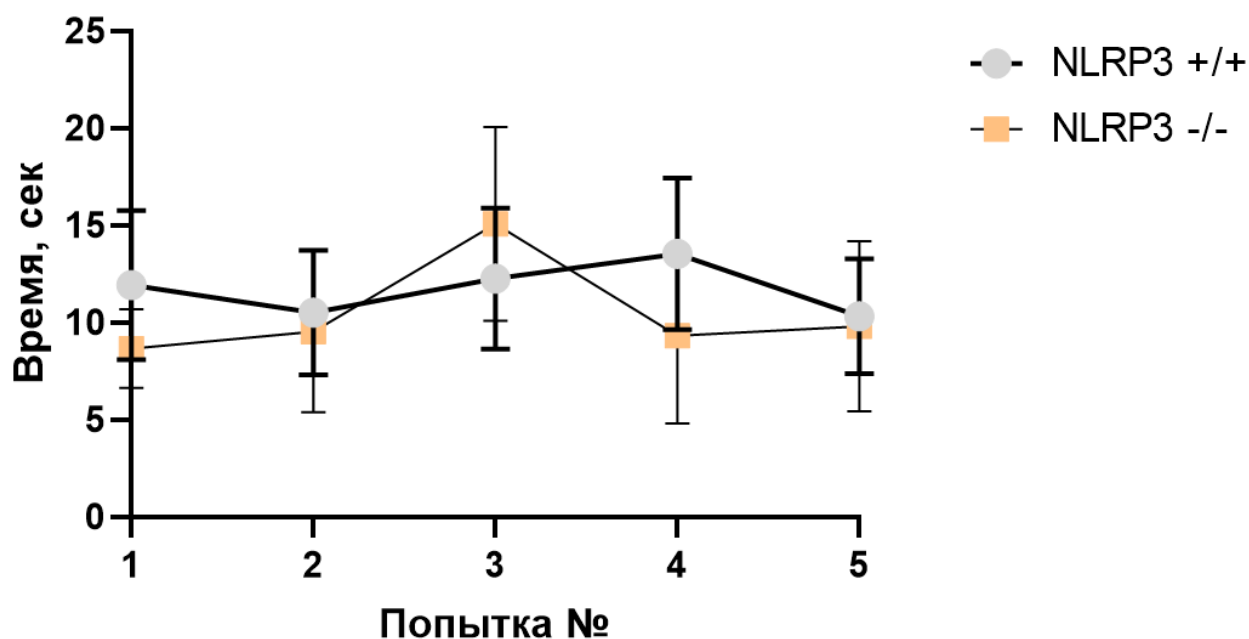


Рисунок 8. Оценка социальной памяти в «пятипопыточном тесте». Время социального взаимодействия, сек. Данные проставлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего $M \pm SE$. U-критерий Манна-Уитни.

При оценке эмоционального статуса, депрессивно-подобного и мотивационного поведения в тесте «подвешивание за хвост» не было выявлено статистически значимых отличий у $NLRP3^{-/-}$ животных и животных контрольной группы.

Это свидетельствует о том, что у $NLRP3^{-/-}$ животных мотивационное поведение не нарушено. (Рисунок 9)

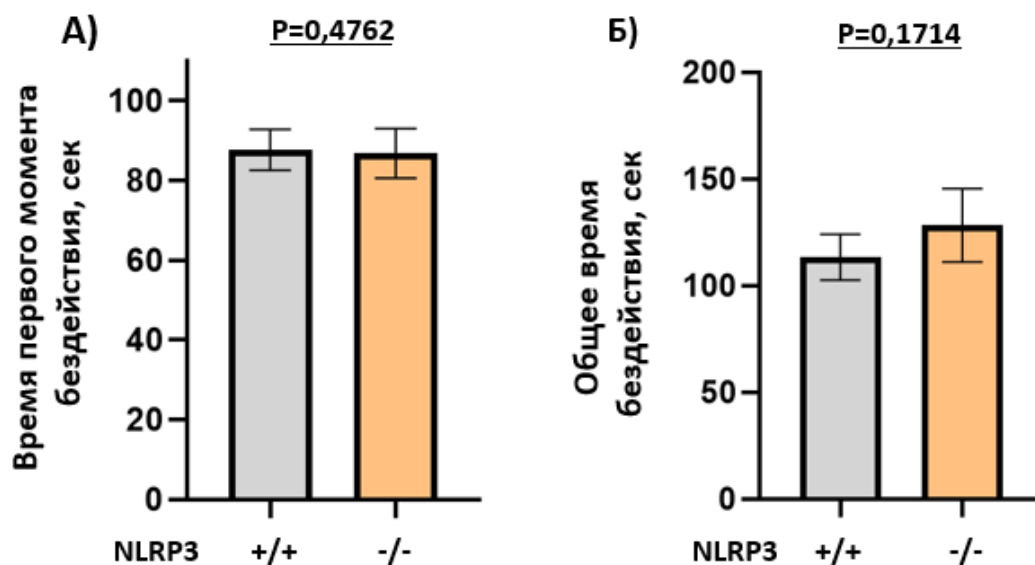


Рисунок 9. Оценка эмоционального статуса, депрессивно-подобного и мотивационного поведения в тесте «подвешивание за хвост». А) Время первого момента бездействия, сек; Б) Общее время бездействия, сек. Данные проставлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего $M \pm SE$. U-критерий Манна-Уитни.

При оценке эмоционального статуса, депрессивно-подобного и мотивационного поведения в тесте «принудительное плавание» было выявлено, что у $NLRP3^{-/-}$ животных статистически значимо ($p \leq 0,05$) повышено общее время подвижности (Рисунок 10 Б).

Это указывает на то, что у $NLRP3^{-/-}$ животных мотивационное поведение не нарушено, однако по эмоциональному статусу являются более беспокойными. (Рисунок 10)

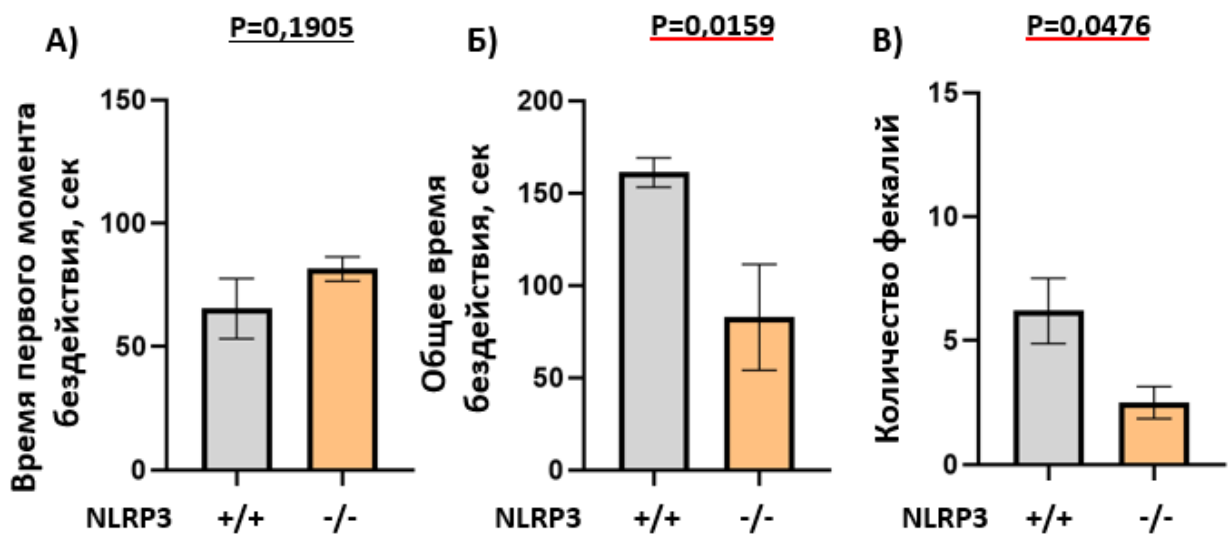


Рисунок 10. Оценка эмоционального статуса, депрессивно-подобного и мотивационного поведения в тесте «принудительное плавание». А) Время первого момента бездействия, сек; Б) Общее время бездействия, сек; В) Количество фекалий. Данные проставлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего $M \pm SE$. U-критерий Манна-Уитни.

При оценке весовых показателей было выявлено, что вес у $NLRP3^{-/-}$ животных статистически значимо отличался ($p \leq 0,001$) от веса контрольной группы. (Рисунок 11)

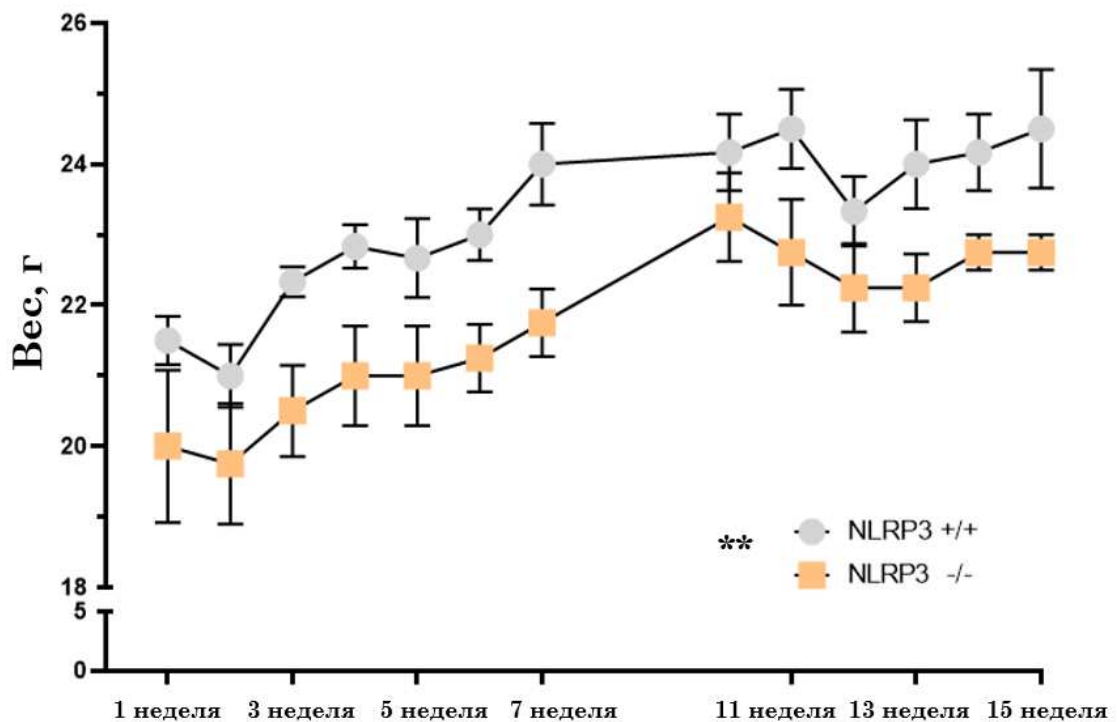


Рисунок 11. Оценка весовых показателей мышей.

2. Результаты иммуноферментного анализа

При проведении иммуноферментного анализа (Рисунок 12) гомогенизированных регионов мозга, плазмы крови и ликвора мышей двух групп было выявлено: самки $NLRP3^{-/-}$ мышей имеют тенденцию к повышенному уровню ОХТ в гипоталамусе (Рисунок 12А) и гиппокампе (Рисунок 12Б), однако также имеют тенденцию к пониженному уровню ОХТ в миндалевидном теле (Рисунок 12В). Также наблюдается тенденция к снижению уровня ОХТ в ликворе у $NLRP3^{-/-}$ мышей. (Рисунок 12Д)

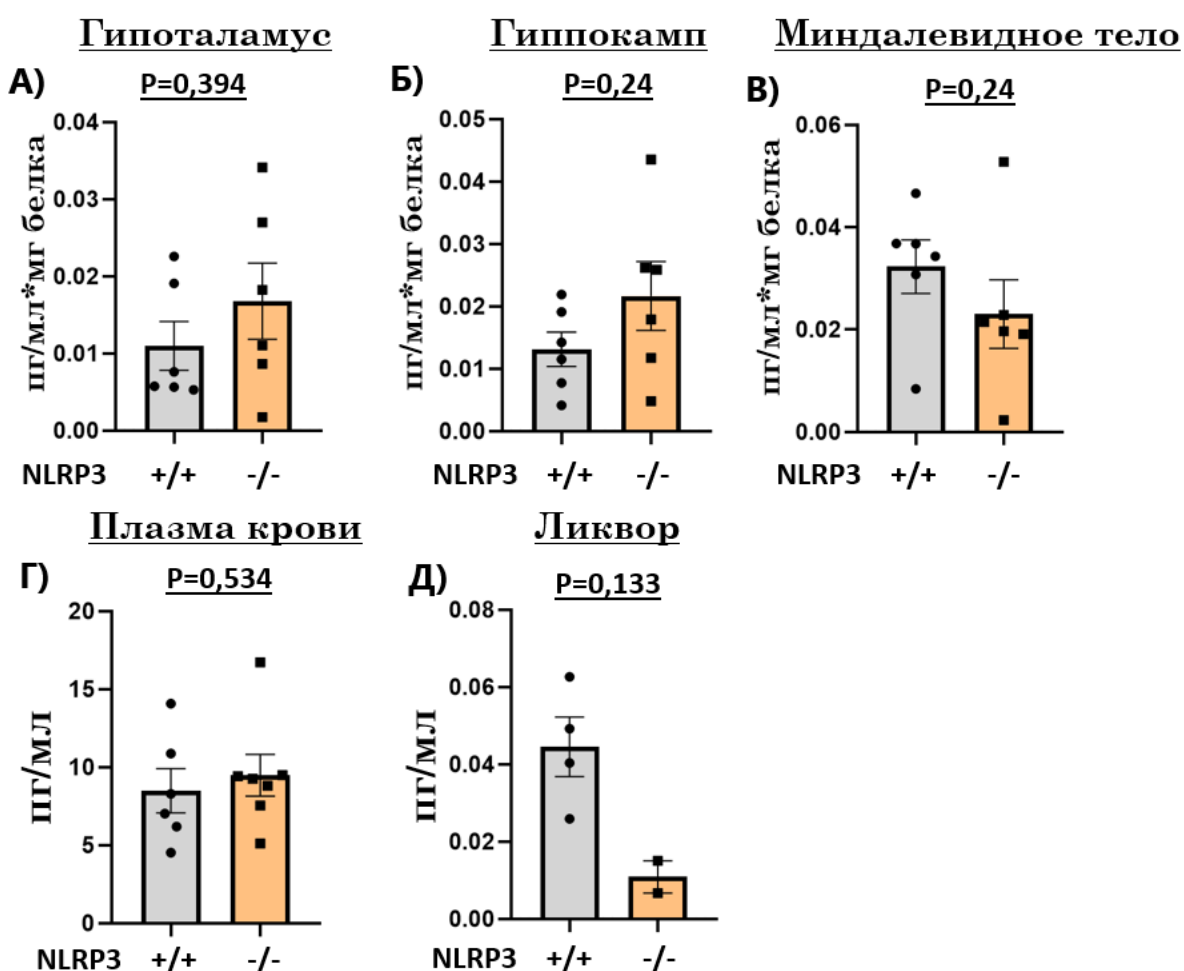


Рисунок 12. Содержание ОХТ в гомогенатах тканей головного мозга, крови и спинномозговой жидкости у мышей по результатам ИФА. А) уровень ОХТ в гомогенизированном регионе гипоталамуса, пг/мл*мг белка; Б) уровень ОХТ в гомогенизированном регионе гиппокампа, пг/мл*мг белка; В) Уровень окситоцина в гомогенизированном регионе миндалевидного тела, пг/мл*мг белка; Г) уровень окситоцина в плазме крови, пг/мл; Д) уровень окситоцина в ликворе, пг/мл.

3. Результаты иммуногистохимического анализа

При проведении ИГХ сагиттальных срезов мозга мышей обеих групп (Рисунок 13) было выявлено: самки $NLRP3^{-/-}$ мышей имеют большее количество окситоцинергических нейронов в гипоталамусе (Рисунок 13А), гиппокампе (Рисунок 13Б) и миндалевидном теле (Рисунок 13В).

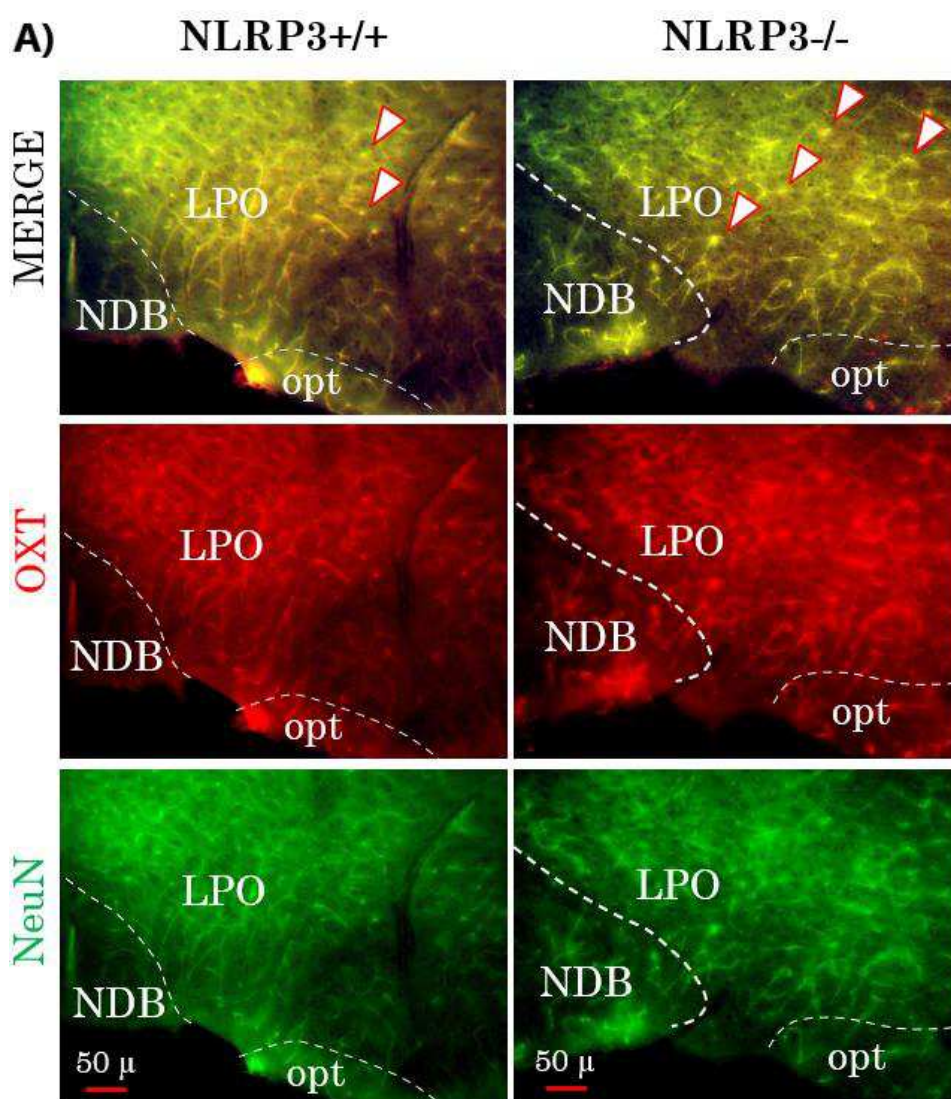


Рисунок 13 А. Данные иммуногистохимического анализа. Микроскопия сагиттальных срезов мозга в регионе гипоталамуса, 2,90 мм.

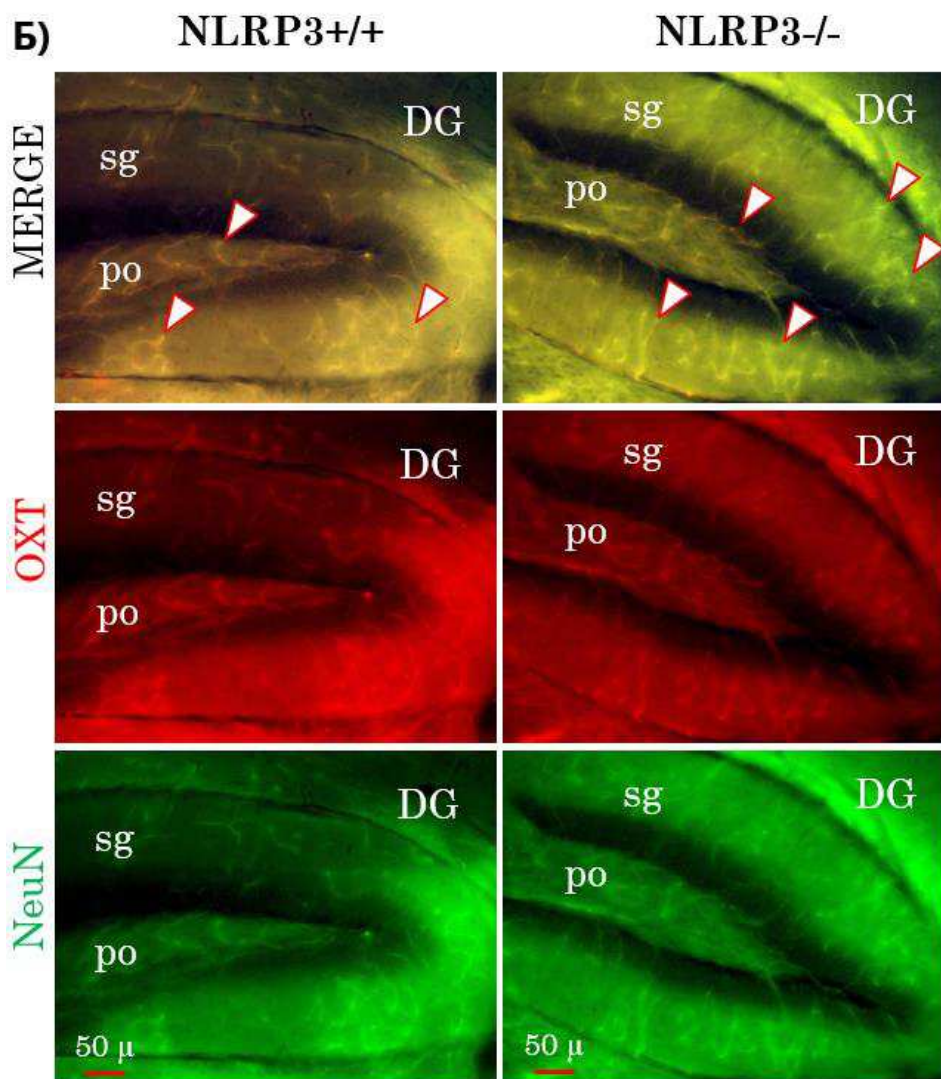


Рисунок 13 Б. Данные иммуногистохимического анализа. Микроскопия сагиттальных срезов мозга в регионе гиппокампа, 3,90 мм.

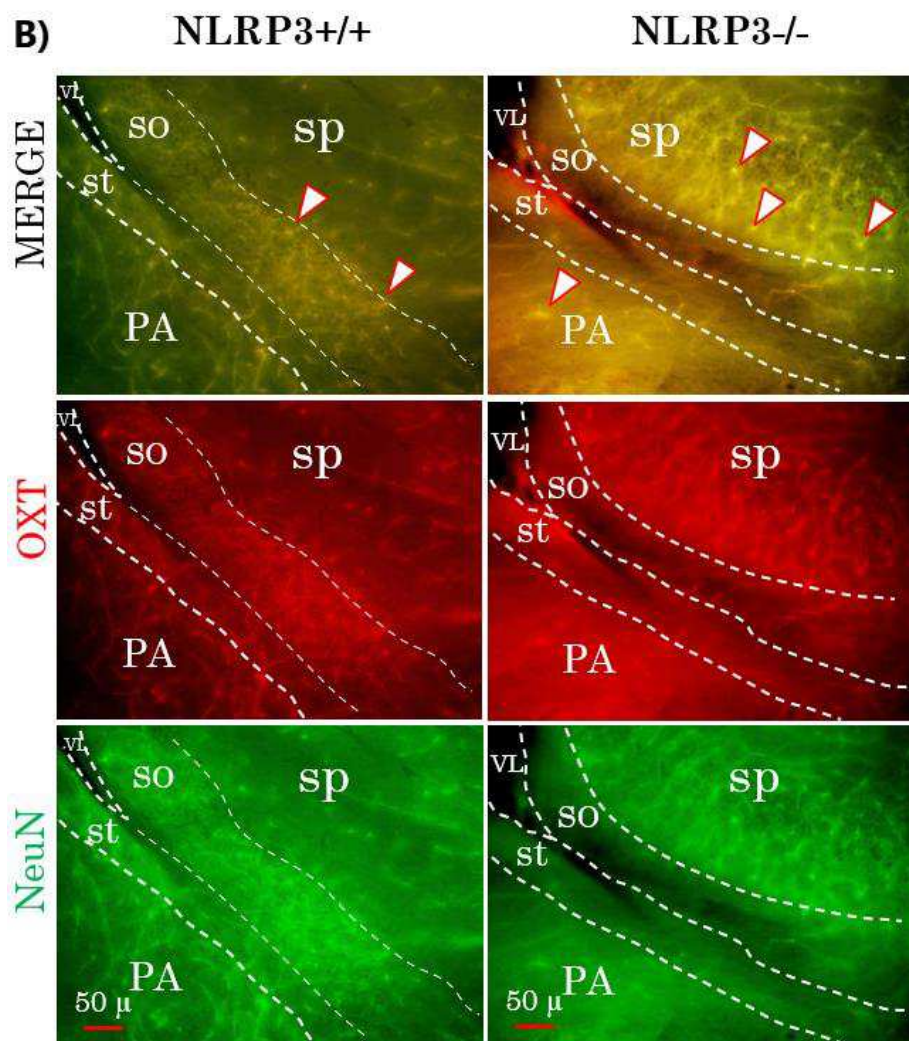


Рисунок 13 В. Данные иммуногистохимического анализа. Микроскопия сагиттальных срезов мозга в регионе миндалевидного тела, 4,60 мм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа серии нейроповеденческих тестирований можно заключить, что у самок NLRP3-дефицитных мышей выявлены следующие особенности поведения (Таблица 1):

Таблица 1. Сравнительный анализ поведенческих реакций самок мышей C57BL6 и NLRP3^{-/-}

Тип поведения	Факторы оценки	NLRP3 +/+	NLRP3 -/-
Тревожность и беспокойство	Предпочтение периферии	+	+++
	Предпочтение закрытых пространств	+++	+
Двигательная активность	Активное передвижение в тесте	+	+++
Исследование новых объектов	Интерес к неодушевленному предмету	+++	+
Социализация	Интерес к социальному объекту	+++	+
Мотивационное поведение	Инстинкт самосохранения	+	+

На основании анализа биохимических и иммуногистохимических исследований можно заключить, что у самок NLRP3-дефицитных мышей выявлены следующие особенности (Таблица 2):

Таблица 2. Сравнительный анализ биохимических особенностей самок мышей C57BL6 и NLRP3^{-/-}

Типы исследования	Регион головного мозга	NLRP3+/+	NLRP3-/-
ИФА	Гипоталамус	+	+++
	Гиппокамп	+	+++
	Миндалевидное тело	+++	+
	Плазма крови	+	+

	Ликвор	+++	+
ИГХ	Гипоталамус	+	+++
	Гиппокамп	+	+++
	Миндалевидное тело	+	+++

Выводы

1. Самки NLRP3^{-/-} мышей демонстрируют повышенную двигательную активность и предпочтение периферии в лабиринтах.

2. Самки NLRP3^{-/-} мышей избегают новых неодушевлённых предметов.

3. Самки NLRP3^{-/-} мышей избегают взаимодействия с новыми мышами-резидентами, демонстрируя нарушение социализации.

4. ИФА показал, что самки NLRP3^{-/-} мышей имеют тенденцию к повышенному уровню ОХТ в гипоталамусе и гиппокампе, однако имеют тенденцию к пониженному уровню ОХТ в миндалевидном теле. Также наблюдается тенденция к снижению уровня ОХТ в ликворе у NLRP3^{-/-} мышей.

5. С помощью ИГХ обнаружено, что самки NLRP3^{-/-} мышей имеют большее количество окситоцинергических нейронов в гиппокампе, гипоталамусе и миндалевидном теле.

Таким образом, самки NLRP3^{-/-} мышей могут выступать моделью для исследования беспокойных и тревожно-депрессивных состояний, сопровождающихся гиперактивностью.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1) Белокоскова С.Г., Цикунов С.Г. Вазопрессин в механизмах реализации реакций на стресс и модуляции эмоций // Научный обзор – 2018 – стр.5
- 2) Горина Я. В., Иптышев А. М., Лопатина О. Л., и др. Анализ пространственной памяти у NLRP3-нокаутных животных // Сибирское медицинское обозрение. 2017. №6 (108).
- 3) Карпова И.В., Бычков Е.Р. и др. Влияние окситоцина на уровень и обмен моноаминов в мозге изолированных мышей высоко- и низкоагрессивной линий // Обзоры по химической фармакологии и лекарственной терапии – 2017 – С. 23-29
- 4) Adhikari A., Lerner T. N., Finkelstein J., Pak S., Jennings J. H., Davidson T. J., et al. (2015). Basomedial amygdala mediates topdown control of anxiety and fear. *Nature*, 527(7577), 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature15698>
- 5) Anderson R. M., Johnson S. B., Lingg R. T., Hinz D. C., Romig-Martin S. A., & Radley J. J. (2019). Evidence for similar prefrontal structural and functional alterations in male and female rats following chronic stress or glucocorticoid exposure. *Cerebral Cortex* (New York, N.Y.: 1991), 30(1), 353–370. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz092>
- 6) Behnia B, Heinrichs M. et. al. Differential effects of intranasal oxytocin on sexual experiences and partner interactions in couples. // *Hormones and Behavior*– 2014 - №3 (64) – С. 308-318
- 7) Campbell, A. (2010). Oxytocin and human social behavior. *Pers. Soc. Psychol. Rev.* 14,281–295
- 8) Eltokhi A., Kurpiers B., Pitzer C. Behavioral tests assessing neuropsychiatric phenotypes in adolescent mice reveal strain- and sex-specific effects/ *Scientific Reports*, 2020, 10:11263 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67758-0>
- 9) Filiou M. D., Nussbaumer M., Teplytska L. and Turck C. W. Behavioral and Metabolome Differences between C57BL/6 and DBA/2 Mouse Strains: Implications

for Their Use as Models for Depression- and Anxiety-Like Phenotypes/ Metabolites
2021, 11, 128. <https://doi.org/10.3390/metabo11020128>

10) Gust K., Caccese C., Larosa A., Nguyen T. V. // Neuroendocrine Effects of Lactation and Hormone-Gene-Environment Interactions. // *Mol Neurobiol.* - 2020 Jan 11

11) Higashida H., Lopatina O., Yoshihara T., Pichugina Y. A., Soumarokov A. A., Munesue T., et al. (2010). Oxytocin signal and social behaviour: comparison among adult and infant oxytocin, oxytocin receptor and CD38 gene knockout mice. *J. Neuroendocrinol.* 22,373–379.

12) Hoge E. A., Lawson, E. A., Metcalf, C. A., Keshaviah, A., Zak, P. J., Pollack, M. H., et al. (2012). Plasma oxytocin immunoreactive products and response to trust in patients with social anxiety disorder. *Depress. Anxiety* 29,924–930.

13) Insel T. R. The challenge of translation in social neuroscience: a review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. // *Neuron* – 2010 - №6 (65) – С. 768-779

14) Jones C, Barrera I, Brothers S, Ring R, Wahlestedt C. Oxytocin and social functioning. *Dialogues Clin Neurosci.* 2017; 19(2):193-201. doi:10.31887/DCNS.2017.19.2/cjones

15) Koshimizu T.A., Nakamura K., Egashira N. и др. Vasopressin V1a and V1b Receptors: from Molecules to Physiological Systems. // *Physiol Rev* – 2011 - №92(4) - С.1813-1864

16) Lee H.C. Cyclic ADP-ribose and NAADP as Messengers for Calcium Mobilization. // *Journal of Biomedical Chemistry* – 2012 - №38 (287) – С. 31633-31640

17) Li Dai, C. Sue Carter, и др. Oxytocin and Vasopressin Are Dysregulated in Williams Syndrome, a Genetic Disorder Affecting Social Behavior // *PLoS One* – 2012 - №7(6)

18) Liu H. X., Lopatina O., Higashida C., и др. // Displays of paternal mouse pup retrieval following communicative interaction with maternal mates. // *Nat Commun.* 2013;4:1346

- 19) Liu, H. X., Lopatina, O., Higashida, C., Fujimoto, H., Akther, S., Inzhutova, A., et al. (2012b). Displays of mouse pup retrieval as a paternal parental behaviour following communicative interaction with the maternal mate. *Nature Commun.*
- 20) Matsushita H, Latt HM, Koga Y, Nishiki T, Matsui H. Oxytocin and Stress: Neural Mechanisms, Stress-Related Disorders, and Therapeutic Approaches. *Neuroscience*. 2019;417:1-10.doi:10.1016/j.neuroscience.2019.07.046
- 21) Meyer-Lindenberg A.et. al. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. // *Nature Reviews Neuroscience* – 2011 - №9 (12) – C. 524-538
- 22) Modi, M. E., and Young, L. J. (2012). The oxytocin system in drug discovery for autism: animal models and novel therapeutic strategies. *Horm. Behav.* 61,340–350.
- 23) Onaka T, Takayanagi Y. Role of oxytocin in the control of stress and food intake. *J Neuroendocrinol.* 2019;31(3):e12700. doi:10.1111/jne.12700
- 24) Phua D. Y., Kee M. Z. L., Meaney M.J. // Positive Maternal Mental Health, Parenting, and Child Development. // *Biol Psychiatry.* - 2019 Oct 16.
- 25) Serati M., Grassi S., Redaelli M., и др. // Is There an Association Between Oxytocin Levels in Plasma and Pregnant Women's Mental Health? // *J Am Psychiatr Nurses Assoc.* - 2019 Nov 29
- 26) Whitley J., Wouk K., Bauer A.E., и др. // Oxytocin during breastfeeding and maternal mood symptoms. // *Psychoneuroendocrinology.* - 2019 Dec 31 - 113:104581.

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

« 17 » июня 2021 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Особенности поведенческих реакций самок мышей, дефицитных по NLRP3

Руководитель

Лопатина 17.06.2021

подпись, дата

проф., д.б.н. О. Л. Лопатина

Выпускник

Чалышева 17.06.2021

подпись, дата

А. Е. Чалышева

Красноярск 2021