

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ _____
подпись инициалы, фамилия
« ____ » _____ 20 __ г.

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология
06.03.01.07 Биофизика

Влияние α - и γ -интерферонов на интегративные функции крыс при
депрессии

Научный руководитель _____
подпись, дата

к.ф.-м.н А.Н. Шуваев
ученая степень инициалы, фамилия

Научный консультант _____
подпись, дата

д.м.н Н.А. Малиновская
ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник ББ14-01 Б _____
подпись, дата

К.В. Смирнова
инициалы, фамилия

Красноярск 2018

Реферат

Выпускная квалифицированная работа на тему «Влияние α - и γ -интерферонов на интегративные функции крыс при депрессии» содержит 38 страницы текстового документа, 28 использованных источников, 7 листов графического материала.

Ключевые слова: α -ИНТЕРФЕРОНЫ, γ -ИНТЕРФЕРОНЫ, ДЕПРЕССИЯ, МОДЕЛЬ СТРЕССА РАННЕГО ПЕРИОДА ЖИЗНИ, ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ТЕСТЫ, ИММУНОГИСТОХИМИЯ, ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ.

Цель исследования - оценка эффектов α - и γ -ИФ для выявления их нейропротекторных или нейротоксических свойств на крысах с моделью депрессии и без неё, с дальнейшим исследованием экспрессии рецепторов к интерферонам на срезах мозга методом флуоресцентной микроскопии.

Исследование проводилось на крысах возрастом P27-P28 с однократным введением препаратов α - или γ -интерферонов в концентрации 5000 МЕ или физиологического раствора. Оценка изменений в поведении животных проводилась с помощью поведенческих тестов – NSS-тест, тест на гипонеофагию, «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт», проводились иммуногистохимия на свободно-плавающих срезах и флуоресцентная микроскопия.

Результаты исследования показали, что при депрессии ИФ оказывают в основном негативный эффект как в контроле, так и при развитии депрессии, в некоторых случаях γ -ИФ оказал нейропротекторную роль. Однако, α - и γ -ИФ по-разному влияют на экспрессию рецепторов к ИФ в контроле, но при депрессии экспрессия рецепторов при введении обоих видов интерферонов снижается, что может являться причиной негативных эффектов ИФ у животных.

Таким образом, влияние ИФ на организм животного можно рассматривать с точки зрения создания комбинированных моделей депрессии, в связи с усилением стрессогенности даже при их однократном применении.

Содержание

Реферат	2
Содержание	3
Введение	5
Задачи исследования:	5
1. Литературный обзор	6
1.1. Интерфероны и их эффекты	6
1.2. Влияние интерферонов на течение заболеваний центральной нервной системы	6
1.2.1. Интерфероны и болезнь Альцгеймера	6
1.2.2. Эффекты γ -ИФ при ишемии	7
1.2.3. Эффекты β -ИФ и их применение в лечении рассеянного склероза ...	7
1.2.4. Влияние α -ИФ на развитие депрессии	7
1.3. Иммунитет и нервная система	8
1.3.1. Роль воспаления в развитии психических расстройств	8
1.3.2. Интерферон-продуцирующие клетки ЦНС	9
1.3.3. Клетки ЦНС, воспринимающие ИФ	9
1.4. Области мозга, подверженные изменениям при депрессии	10
1.4.1. Гиппокамп	10
1.4.2. Энторинальная кора	10
1.4.3. Миндалевидное тело	11
2. Материалы и методы	12
2.1. Применяемые растворы	12
2.2. Объект исследования и дизайн эксперимента	12
2.3. Проводимые тесты	12
2.3.1. NSS-тест	12
2.3.2. Открытое поле	13
2.3.3. Гипонеофагия	13
2.3.4. Приподнятый крестообразный лабиринт	14
2.3.5. Оценка тестов. Программа для видеотрекинга ANY-maze	14
2.4. Работа с биологическим материалом	14
2.4.1. Подготовка материала, приготовление срезов	14
2.4.2. Иммуногистохимия	16

2.4.3. Флуоресцентная микроскопия на системе «ZOE fluorescent Cell imager»	17
2.4.4. Обработка и анализ изображений с помощью ImageJ.....	18
2.4.5. Статистический анализ	18
3. Результаты и их обсуждение.....	19
3.1. Результаты тестов.....	19
3.1.1 NSS-тест	19
3.1.2. Гипонеофагия.....	20
3.1.3. Тест «Открытое поле».....	20
3.1.4. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт».....	22
3.2. Результаты иммуногистохимии.....	23
3.2.1. Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к α -ИФ и площадь экспрессии рецепторов	23
3.2.2. Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к γ -ИФ и площадь экспрессии рецепторов к γ -ИФ	25
Заключение	28
Список сокращений	29
Литература	30
Приложение А. Дизайн эксперимента	32
Приложение Б. Создание модели стресса раннего периода жизни	33
Приложение В. Протокол NSS-теста	34
Приложение Г. Примеры нормального и депрессия-подобного поведения в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт»	35
Приложение Д. Подготовка биологического материала к иммуногистохимии и ее основные этапы.....	36
Приложение Е. Протокол иммуногистохимии на свободно-плавающих срезах (Abcam, Великобритания)	37
Приложение Ж. Интерпретация диаграмм «ящик с усами».....	38

Введение

В настоящее время интерфероны (ИФ) активно используются для лечения различных заболеваний, однако они имеют побочные эффекты и оказывают влияние на функциональность органов или систем органов. В частности со стороны центральной нервной системы (ЦНС) наблюдается развитие депрессивных состояний у пациентов, проходящих ИФ-терапию. Но ИФ могут иметь не только отрицательные эффекты, но и положительные [1]. В этом ключе было интересно исследовать влияние наиболее популярных препаратов ИФ с широким спектром действия на интегративные функции головного мозга. Работа над изучением мозга включает в себя множество этапов, в том числе тестирование, забор материала от животных и его дальнейшее исследование различными методами.

Цель данного исследования – оценка эффектов α -и γ -ИФ для выявления их нейропротекторных или нейротоксических эффектов и влияние на экспрессию рецепторов к интерферонам на крысах с моделью депрессии и без неё.

Задачи исследования:

1. Оценить выраженность неврологического дефицита у крыс в физиологических условиях и при депрессии без инъекций интерферонов и с их введением.
2. Выяснить изменения принятия новой пищи крысами с моделью депрессии и без нее под действием интерферонов и без них.
3. Оценить стрессогенность крыс в физиологических условиях и с моделью депрессии без введения интерферонов и с их введением.
4. Выяснить, какие эффекты оказывали интерфероны на поведение животных при развитии депрессии и в контроле.
5. Изучить особенности экспрессии рецепторов к интерферонам в различных областях головного мозга крыс с депрессией при введении интерферонов и без их использования.

1. Литературный обзор

1.1. Интерфероны и их эффекты

Интерфероны (ИФ) были открыты в 1957 году А. Айзеком и Дж. Линдеманом. Они продуцируются многими типами клеток, но особенно скорость их синтеза возрастает при воздействии вирусов на организм. Воздействуя на специальные рецепторы ИФ запускают каскады реакций, активируя гены ответственные за ответную реакцию организма, иммунную и не только [2].

Различают три типа ИФ по их свойствам и рецепторам: ИФ I типа или не иммунные ИФ, специфичны только для позвоночных животных. К ним относятся α -ИФ, продуцируемые лейкоцитами, β -ИФ продуцируемые фибробластами и некоторые другие представители: ω -, δ - и τ -ИФ. Оказывают противовирусные, антипролиферативные и иммуномодулирующие эффекты. У людей ИФ этого типа присоединяются к рецепторам α -ИФ, состоящему из двух субъединиц, расположенных почти на всех типах клеток [2].

ИФ II типа представлены исключительно γ -ИФ его функции схожи у разных видов животных, в том числе и у человека. Выделяются лейкоцитами и определяют направление роста, созревание и дифференцировку различных типов клеток, усиливают работу натуральных киллеров и регулируют выработку и видоизменение иммуноглобулинов В-лимфоцитов, выработка иммуноглобулинов. Эффекты этих ИФ так же очень разнообразны: регуляция иммунных процессов, включая противовирусное, бактерицидное и противоопухолевое действие, а так же подавление аутоиммунных заболеваний [2].

ИФ III типа представлены только λ -ИФ, рецептором которого являются комплексы рецепторов различных ИФ-I и ИФ-II типа. Так же как и ИФ-I они экспрессируются в ответ на вирусную инфекцию, но в отличие от них более специализированы и представлены в основном на эпителиальных поверхностях [2].

1.2. Влияние интерферонов на течение заболеваний центральной нервной системы

1.2.1. Интерфероны и болезнь Альцгеймера

Нейровоспаление, как считается, является одним из важнейших предпосылок при развитии болезни Альцгеймера (БА). В этом ключе понимание соотношения цитокинов, в том числе и уровней ИФ I и II типа, является важным вопросом для понимания патогенеза БА. Было обнаружено усиление сигнала от рецепторов ИФ I типа на гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ) и одновременное снижение ответа ИФ II типа у пожилых мышей с когнитивными отклонениями [3].

Результаты других исследований показали, что изменения в

соотношении ИФ могут способствовать нейровоспалению, амилоидной патологии и когнитивной дисфункции при БА. Также было замечено, что в ответ на появление β -амилоида 1-42, эпителиальные клетки сосудистых сплетений сверхэкспрессируют гены ИФ I типа, но не гены ИФ II типа [4].

1.2.2. Эффекты γ -ИФ при ишемии

При приложении препаратов γ -ИФ к животным с моделью ишемии, было замечена тенденция к усилению смертности крыс, что может свидетельствовать о его нейротоксическом эффекте. Однако, на остальных животных γ -ИФ не оказывал значимого нейротоксического или нейропротективного эффекта, по данным теста NSS. Данные исследований *in vitro* свидетельствуют о снижении активности НАД(Ф)Н-оксидазы клеток при ишемии головного мозга до приложения γ -интерферона, однако после приложения наблюдалось значимое увеличение её активности [5].

1.2.3. Эффекты β -ИФ и их применение в лечении рассеянного склероза

Связываясь с рецепторами на клеточной мембране, β -ИФ активирует внутриклеточные каскады реакций, приводящие к экспрессии генных продуктов с иммуномодулирующими и противовоспалительными свойствами, благодаря которым этот вид ИФ активно используется при лечении рассеянного склероза. Кроме того, β -ИФ ингибирует активность Т-лимфоцитов и их пролиферацию, оказывает эффект на перемещение лейкоцитов через ГЭБ, стимулирует экспрессию трофических факторов, показывают способность β -ИФ снижать токсические эффекты глутамата. В целом, β -ИФ, по данным литературы, оказывает протекторное действие на клетки ЦНС [6].

Эксперименты *in vitro* с использованием технологии Patch-clamp показывают, что при воздействии β -ИФ снижается амплитуда возбуждающих постсинаптических токов. В этом же исследовании было показано, что это снижение вызвано взаимодействием Ca^{2+} с кальмодулинзависимой протеинкиназой II и, как следствие, изменением клеточного метаболизма в ответ на введение препарата [6].

1.2.4. Влияние α -ИФ на развитие депрессии

Клинические исследования показали, что ИФ-терапия при лечении гепатита С (ГС) снижает уровни триптофана (ТРП) и серотонина в плазме и повышает уровень кинуренина (КИН) в плазме и спинномозговой жидкости (СМЖ). Кроме того, у таких пациентов, увеличивается отношение КИН/ТРП, что является показателем активности индоламина 2,3-диоксигеназы (ИДО) – фермента, который катализирует превращение ТРП в КИН, что может привести к образованию нейроактивных метаболитов, таких как кинуреновая кислота, 3-оксикинуренин и хинолиновая кислота (ХК), которая особенно важна в исследовании патогенеза депрессии [7, 8].

Интересно, что уровень ХК в СМЖ, как было обнаружено, коррелирует

с тяжестью симптомов депрессии, а посмертные исследования показали увеличение уровня ХК в микроглиальных клетках в субрегионах лобной коры у пациентов с тяжелой депрессией [7].

Также исследования показали увеличение уровня ХК в гиппокампе вследствие ИФ-терапии, но оказывает противоположное влияние на уровень никотинамида, уровень которого снизился в лобной коре, но увеличился в гиппокампе. Терапия, прямо или косвенно, через другие цитокины, привела к значительно более низкому уровню ТРП в лобной коре и гиппокампе за счет увеличения активности ИДО. За счет этого значительно повышается уровень нейротоксичной ХК в гиппокампе [7].

Хинолиновая кислота является агонистом NMDA-рецепторов, способствуя в высоких концентрациях глутаматной эксайтотоксичности и окислительному стрессу, которые могут вызывать повреждение и гибель нейронов и связанные с ними поведенческие изменения [7].

1.3. Иммуитет и нервная система

Долгое время считалось, что ЦНС изолирована за счет гематоэнцефалического барьера и не способна общаться с другими тканями организма. Однако за последние десять лет учеными было выявлено, что ЦНС не столь обособлена от периферической иммунной системы, как считалось ранее. Она способна активно контролировать иммунные реакции внутри себя. Так, в желудочках, субарахноидальном пространстве и вокруг сосудов дендритные клетки и макрофаги способствуют иммунному ответу, но более ограниченному, нежели в периферических тканях. В паренхиме головного мозга глиальные клетки и нейроны способны модулировать реакции Т-лимфоцитов, выполняя тем самым нейропротекторную функцию [9].

1.3.1. Роль воспаления в развитии психических расстройств

Клинические исследования пациентов, страдающих депрессией, показали что, мембранные рецепторы цитокинов, медиаторов воспаления, которые обладают множеством биологических эффектов, играют важную роль в развитии патологических состояний ЦНС [8].

Существует несколько подтверждающих доказательств этой теории. Во-первых, обнаружено, что увеличивается уровень С-реактивного белка в плазме крови при биполярном расстройстве (БР) и интерлейкина-6 (ИЛ-6) при депрессии и психозе, что может свидетельствовать о нейровоспалительном характере повреждений при данных заболеваниях ЦНС. Во-вторых, доказано, что при лечении гепатита С или меланомы α -интерферонами или ИЛ-2 более, чем у 40% пациентов наблюдается развитие депрессии. Важно отметить, что существует временной разрыв между «психологическими» и «физическими» проявлениями этого иммуностимулирующего лечения, причем нейровегетативные симптомы появляются в течение 1 недели, тогда как настроенческие и когнитивные

симптомы достигают пика через 8-12 недель после начала лечения [8].

Аналогичным образом, тифоидная вакцина и эндотоксин в небольших дозах, которые, как было показано, активируют микроглию в естественных условиях, индуцируют переходные, мягкие депрессивные симптомы у здоровых людей [8].

С другой стороны, цитокины и медиаторы воспаления могут оказывать и позитивный эффект, различным образом воздействуя на функции ЦНС и нейротрансдукцию, в том числе они могут влиять на превращение моноаминов, участвующих в процессе синаптической передачи [8].

1.3.2. Интерферон-продуцирующие клетки ЦНС

Плазмоцитоидные дендритные клетки (ПДК) считаются основными клетками, продуцирующими ИФ, в ответ на вирусные инфекции. Например, было обнаружено, что ИФ, полученный из ПДК, играет важную роль в устойчивости к коронавирусной инфекции. В физиологических условиях ЦНС не содержит ПДК, но микроглиальные клетки и периваскулярные дендритные клетки могут служить фагоцитарными клетками, которые инициируют иммунные реакции. В условиях *in vitro* различные типы клеток ЦНС могут продуцировать ИФ, включая нейроны. Сообщалось, что последние клетки продуцировали ИФ, в зависимости от экспрессии TLR-3 (толл-подобный рецептор 3, отвечающий за врожденный иммунитет и связывание РНК вирусов), после заражения вирусом бешенства или вируса West-Nile [10].

В головном мозге человека при некоторых нейродегенеративных состояниях (болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз и др.) α -ИФ и β -ИФ продуцируются микроглиальными клетками и/или макрофагами. В экспериментах *in vitro* было показано, что в ответ на внедрение вирусной РНК, астроциты и микроглиальные клетки продуцируют α - и β -ИФ [9].

1.3.3. Клетки ЦНС, воспринимающие ИФ

Исследования *in vitro* показали, что все типы клеток ЦНС могут реагировать на ИФ I типа путем экспрессии интерферон-стимулирующих генов (ИСГ). Дополнительно была проанализирована экспрессия гена α -ИФ в нейронах. Нейроны очень чувствительны к α -ИФ и общий отклик нейронов зависит от сигнализации STAT-1(активатор транскрипции). Большинство генов, экспрессия которых, по-видимому, была значительно усилена в нейронах, участвуют в противовирусной защите в ответ на выработку ИФ. Ряд этих генов кодирует белки, которые могут напрямую ингибировать вирусную репликацию (PKR, ADAR-1, Mx и т.д.). Среди других генов, активируемых в ответ на выработку ИФ, выделяют гены, кодирующие компоненты убиквитин-протеасомного пути деградации белков, что вместе с генами главного комплекса гистосовместимости, играют центральную роль в деградации вирусных белков, обработке пептидов и антиген-презентирующей функции [9].

Существуют данные, показывающие, что клетки гематоэнцефалического барьера имеют рецепторы к γ -ИФ, что позволяет оказывать γ -ИФ нейропротекторный эффект на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у мышей. γ -ИФ также стабилизировал целостность церебрального эндотелия и предотвратил проникновение лейкоцитов в мозг, увеличивая экспрессию белков плотных контактов, тем самым показывая, что γ -ИФ может выступать как плейотропный провоспалительный или противовоспалительный цитокин [11].

Более поздние исследования показывают, что мыши с селективной делецией рецептора γ -ИФ в эндотелиальных клетках мозга не развивали индуцированное воспаление, демонстрируя, что эндотелий мозга является критическим местом действия γ -ИФ. При этом циркулирующий γ -ИФ, который связывается с рецепторами на эндотелиоцитах головного мозга, индуцирует экспрессию хемокина Cxcl10, является центральным звеном в цепи сигнализации, вызывающей воспаление, при аверсивном ответе на системное воспаление [12].

1.4. Области мозга, подверженные изменениям при депрессии

1.4.1. Гиппокамп

Гиппокамп участвует в прекращении реакции на стресс по оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники. Накопленные данные свидетельствуют о том, что гиппокамп участвует в подавлении предвосхищающих, но не рефлексивных стрессовых реакций, возможно, в соответствии с его ролью в памяти и обработкой информации. Повреждение гиппокампа может задержать прекращение высвобождения кортикостерона, согласуется с ролью в ингибировании отрицательной обратной связи при действии глюкокортикоидов. Эта гипотеза подтверждается богатой локализацией глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и функциональными исследованиями, демонстрирующими снижение эффективности обратной связи после поражения гиппокампа [13].

1.4.2. Энторинальная кора

Энторинальная кора (ЭК) является воротами к гиппокампу и из него. Глубокие слои энторинальной коры содержат как пирамидальные клетки, так и полиморфные нейроны (гетерогенную группу нейронов). Эти нейроны выступают в других областях коры, многие из которых, в свою очередь, направлены на поверхностные слои энторинальной коры. К тому же, аксонные коллатерали из этих нейронов также нацелены на другие клетки в глубоких и поверхностных слоях. Эти выступы закрывают петлю, образованную поверхностными слоями, к гиппокампу, а выступы гиппокампа возвращаются к глубоким слоям энторинальной коры. Таким образом, энторинальная кора является неотъемлемой частью гиппокампальной системы и памяти [14].

Топографические картины афферентных и эфферентных нейронов

предполагают, что ЭК можно разделить на медиальные и боковые области, каждый из которых может быть далее разделен на дорсальные, промежуточные и боковые полосы. Эти субрегионы ЭК с переменными анатомическими признаками указывают на многогранную роль ЭК в обработке памяти [15].

Некоторые данные показывают важную роль энторинальной коры для пространственной памяти. При повреждении боковой системы ЭК у модельных животных ухудшается признание комбинированной информации об объектах, местоположениях и окружающих условиях, в то время как повреждение медиальной ЭК предпочтительно ухудшает понимание пространственного расположения объектов [15].

1.4.3. Миндалевидное тело

Еще в 1992 году было обнаружено, что миндалевидное тело (миндалина) было вовлечено в патофизиологию депрессии. Миндалина подвержена действию некоторых антидепрессантов и психоделиков, представляет собой сложную подкорковую структуру, чувствительную к эмоциональным раздражителям. Так, было обнаружено, что при функциональных исследованиях с помощью МРТ пациентов с клинической депрессией отмечалась гиперчувствительность миндалины к негативным эмоциональным стимулам [16].

2. Материалы и методы

2.1. Применяемые растворы

В данном исследовании использовались наиболее распространенные препараты ИФ: « α -интерферон человеческий лейкоцитарный» («Микроген») и «Ингарон» (γ -ИФ, НПП «Фармаклон»). Для исключения влияния стресса и раствора для разведения интерферонов (физиологический раствор), в качестве групп сравнения использовались интактные животные, контрольные животные с введением растворителя и животные с депрессией также с введением растворителя (физиологического раствора, ф. р-р), в том же объеме, что и самого интерферона в растворителе, в зависимости от веса животного.

2.2. Объект исследования и дизайн эксперимента

Объект исследования – крысы обоего пола линии Вистар возрастом 27-28 дней массой 45-60 г, которые разделялись на две большие группы (контроль и депрессия). Группы контроля и депрессии делились на подгруппы, в зависимости от вводимого раствора (Приложение А): интактные животные (контроль, К) и животные с моделью депрессии (депрессия, Д) до введения растворов, интактные животные и животные с моделью депрессии после введения физиологического раствора (К+Ф.р-р, Д+Ф.р-р), α -интерферона (К+ α -ИФ, Д+ α -ИФ) и γ -интерферона (К+ γ -ИФ, Д+ γ -ИФ), соответственно.

В проведенном ранее «пилотном» эксперименте были подобраны концентрации α - и γ -интерферонов (при которых не наблюдалось смертности животных, но отмечалась ответная реакция организма на воздействие) - 5000 МЕ для обоих видов ИФ.

В качестве модели депрессии использовалась модель стресса раннего периода жизни. Крысят ежедневно отделяли от самки в течение 3 часов в течение первого периода жизни (послеродовые дни 1-15). Сначала самку отсаживали в отдельную клетку, затем крысят пересаживали в имитацию гнезда: бумажное полотенце, помещенное в пластиковый ящик. При этом коробка содержалась при температуре 30°C. После этой процедуры крысят и самку возвращали в домашнюю клетку (Приложение Б) [17]. Дальнейшие тесты проводились на животных, достигших возраста P27-P28.

2.3. Проводимые тесты

2.3.1. NSS-тест

Для выявления общей неврологической дисфункции и исключения грубых неврологических нарушений использовалась шкала NSS-теста. Это стандартный неврологический тест, позволяющий исследовать в динамике состояния моторной, рефлекторной, координаторной и сенсорной функции до и после моделирования заболеваний ЦНС (в частности, ишемии головного

мозга), наличие очаговой симптоматики повреждения мозга. Сумма баллов в тесте отражает степень повреждения головного мозга животных (Приложение В.).

2.3.2. Открытое поле

Тест открытое поле (ОП) представляет собой круглую площадку площадью 1 м^2 , ограниченную бортами по 20 см. С помощью видеосъемки регистрируется ряд элементарных двигательных актов и поз, которые характеризуют физиологическое поведение. Съемка проводится в течение 8 минут, при обработке видеофайлов проводится регистрация исследуемых параметров в течение последних 5 минут съёмки:

- Вертикальная и горизонтальная двигательная активность;
- Подвижность в тесте;
- Грумминг (умывание);
- Исследование отверстий;
- Количество дефекаций и уринаций;
- Моторные нарушения (шаткость походки, тремор и т.д.)

Тест позволяет выявить нарушения спонтанной двигательной активности, вегетативных функций (например, учащение или урежение уринаций и дефекаций, изменение консистенции болюсов), нарушения эмоциональной реакции крыс (длительное замирание и снижение частоты грумминга, об эмоциональности также можно судить по изменению дефекации у крыс и т.д.) [18].

Многие анализируемые показатели теста (число норковых рефлексов и эпизодов замирания, пройденный в м, суммарное время замирания в секундах) записывались и оценивались с помощью программы для видеотрекинга ANY-maze (фирма Stoelting Co., США), за исключением учета количества болюсов и уринаций, подсчет которых производился вручную (Приложение Г).

2.3.3. Гипонеофагия

Тест на принятие новой пищи отражает осторожность животного по отношению к новому незнакомому объекту среды. В норме для животного характерно исследовательское поведение, тогда как при тревожно-депрессивном расстройстве животное либо ведет себя беспокойно и тревожно, либо же, напротив, забивается в угол и замирает [19].

Тест проводился следующим образом: в пустую клетку, предварительно протертую спиртом, помещался свежий арахис и туда же помещали крысенка в возрасте P27. В течение пяти минут регистрировалось число подходов к ореху. По окончании теста клетка снова протиралась спиртом. На следующий день крысят в возрасте P28 снова тестировали, но в качестве пищи использовался другой пищевой стимул (жареный арахис).

2.3.4. Приподнятый крестообразный лабиринт

С помощью приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) определяется степень тревожности крысы, способность животного оценивать риск, позволяет определить исследовательскую и двигательную активность, а также эмоциональное состояние особи. Установка состоит из двух закрытых и двух открытых рукавов, высота над полом 1 м. Животное помещается в центр лабиринта, тест продолжается три минуты [18].

В тесте оценивали время пребывания в закрытых и открытых рукавах, количество заходов в открытые и закрытые рукава, длительность нахождения в центре, частота заходов в центр теста. Все анализируемые показатели теста записывались и оценивались с помощью программы для видеотрекинга ANY-maze (фирма Stoelting Co., США) (Приложение Г).

2.3.5. Оценка тестов. Программа для видеотрекинга ANY-maze

Видеотрекинг – способ определения положения одного или нескольких движущихся объектов по их видеоизображению. Применительно к поведению животных, он является важнейшим методом автоматизации и унификации экспериментов. Этот метод даёт информацию о пройденном пути, скорости и ускорении животного, а также, в случае использования более сложных алгоритмов, данные о направлении движения и положении отдельных частей тела животного [20].

Для отслеживания животного внутри сцены используется традиционный метод видеослежения, основанный на «вычитании фона» [21].

Одним из представителей подобного ПО является программа для видеотрекинга ANY-maze американской фирмы «Stoelting Co». Система ANY-maze позволяет проводить видеонаблюдение за любыми животными в любых экспериментальных условиях с использованием обычного портативного компьютера и USB или FireWire видеокамеры. Программа также позволяет автоматизацию сложных систем, состоящих из нескольких видеокамер и экспериментальных устройств [20, 22].

Однако ANY-maze имеет и ряд недостатков. Так, при определении положения тела животного используется небольшое число (11-13) состояний поведения, при которых достоверно определяется только положение центра тела животного. Определение же состояний поведения (стойки, грумингов и т.д.) - распознаётся программой не всегда достоверно. Предполагается, что животные могут находиться только в одном из состояний, а это означает, что в автоматическом режиме невозможно определить смешанные элементы поведения и переходы одного состояния в другое, минуя какие-либо стандартные промежуточные (например, переход из груминга в стойку). К тому же невозможно дифференцировать нетипичные проявления поведения животных в опытах (обгрызание элементов установки, копание и т.п.) [23].

2.4. Работа с биологическим материалом

2.4.1. Подготовка материала, приготовление срезов

Главным требованием при взятии материала являются: максимальное сокращение сроков взятия, минимальное травмирование тканей, создание оптимальных условий для фиксации [24]. Подготовка биологического материала к иммуногистохимии включает правильное взятие материала, его фиксацию, криоконсервацию, нарезку и хранение срезов.

Существует ряд общих принципов проведения фиксации головного мозга:

1. Объем фиксирующей жидкости должен превышать объём сохраняемой ткани примерно в 20 раз;
2. Длительность фиксации зависит от свойств фиксатора и его способности проникать в ткань;
3. Различные фиксаторы сохраняют различные структурные компоненты клетки;
4. Размер кусочков ткани должен быть таким, чтобы обеспечить оптимальное проникновение фиксатора;
5. Фиксацию проводят при комнатной температуре.

Чаще всего после извлечения мозга его фиксация производится в 10% PBS-буференном формалине, однако срок фиксации не должен превышать 7 дней [25].

Широкое применение формалин получил благодаря ряду свойств:

- Высокой степени диффузии;
- Способности хорошо сохранять форму, окраску и структуру исследуемого объекта;
- Оказывать длительное фиксирующее действие (до нескольких лет), существенно не ухудшая при этом качество материала;
- Способности хорошо сохранять жиры и липоиды.

Высокая диффузионная способность и незначительное осаждающее действие обеспечивают довольно быстрое и глубокое проникновение формалина в ткани. Срок фиксации тканей в формалине 24-48 ч, при больших кусочках материала время фиксации может достигать до 1 недели. Слишком длительное хранение препаратов в растворе формалина придает тканям чрезмерную плотность, затрудняющую дальнейшую обработку и ухудшающую качество препарата; может приводить к «маскировке» антигенов, что осложняет последующее проведение иммуногистохимии [24].

Чтобы ткани можно было использовать для иммуногистохимического исследования (в частности, для нарезки срезов на вибротоме или микротоме, для криоконсервации с возможностью заморозки образцов), кусочки ткани нужно пропитать такой средой, которая превратила бы их в хорошо режущуюся массу. Такой пропиткой может служить 30% раствор сахарозы, ксилитол или парафин [24].

Ткани, пропитанные в сахарозе требуют более осторожного обращения, поэтому для приготовления срезов может использоваться специальный аппарат - в данной работе был использован вибротом «Microm HM 650V» компании Thermo Fisher Scientific (США).

Для работы использовались сагиттальные срезы мозга толщиной 70 мкм, взятые на одном уровне (латерально 4,20-4,60 мм) согласно атласу стереотаксических координат (необходимо, чтобы на срезе были хорошо заметны гиппокамп с зубчатой извилиной, базолатеральная миндалина и энторинальная кора) (Приложение Д).

2.4.2. Иммуногистохимия

Иммуногистохимия является одним из наиболее распространенных методов изучения активности клеток. Принцип метода основан на взаимодействии антиген-антитело, что позволяет пометить клетку флуоресцентной или ферментативной меткой [26].

Антитела являются существенным компонентом иммунного ответа. Их функция состоит в том, чтобы идентифицировать и затем специфически связывать чужеродные молекулы, что приводит к генерации иммунных реакций, таких как активация комплемента и фагоцитоз. Эта способность антител специфически распознавать многочисленные отличительные молекулы, делает их незаменимыми инструментами исследования. Кроме того, их способность идентифицировать биологические молекулы в клетках и тканях служит основой для иммуногистохимического метода [26].

Сродство к антителу определяется как прочность связывающего взаимодействия между антигеном и антителом. Это зависит от близости стереохимической подгонки между сайтами антител и детерминантами антигена, размерами области контакта между ними и распределением заряженных и гидрофобных групп. В стабильном состоянии, когда предпочтительна ассоциированная форма антигена и антитела, антитело называют более высоким сродством. Обычно связывание антитела с антигеном происходит в течение 1 часа при комнатной температуре, когда система антитело-антиген достигает равновесия [26].

Ферментативная или флуоресцентная метка может связываться непосредственно с первичным антителом, которое базируется против белка-мишени вторичным антителом, которое, в свою очередь, распознает первичное антитело или соединение системы амплификации [26].

В методе иммунофлуоресценции используются флуоресцентные метки для визуализации субклеточного распределения представляющей интерес молекулы. Обычно срезы тканей инкубируют с флюорохром-конъюгированными вторичными антителами или комплексами авидин-биотин. В некоторых случаях первичные антитела, конъюгированные с флуоресцентными метками, наносят непосредственно на секции тканей. Эта прямая маркировка уменьшает количество шагов в протоколе окрашивания и, что более важно, часто предотвращает перекрестную реактивность и высокую фоновую окрашивания. С другой стороны, она снижает специфичность связывания [26].

После иммунофлуоресцентного окрашивания участки ткани просматривают с использованием флуоресцентного микроскопа,

оснащенного набором фильтров для формирования флюорохромов в соответствии с их характеристиками излучения и возбуждения. В иммуногистохимии, наиболее часто используемые флуоресцентные красители представляют собой флуоресцеин (например, изотиоцианат флуоресцеина (FITC), зеленый, возбуждение 494 нм, излучение 521 нм) и родамин (например, Техас Красный, красный, возбуждение 595 нм, эмиссия 615 нм) дериваты. Другие производные родамина включают флуорофоры, такие как красители Alexa Fluor. Спектры возбуждения и излучения серии Alexa Fluor покрывают видимый спектр и распространяются в инфракрасный (например, Alexa Fluor 350, синий, Alexa Fluor 488, зеленый, Alexa Fluor 680, красный) [26].

В настоящей работе после нарезки срезы помещались в планшеты с консервантом (PBS с азидом натрия). Для проведения иммуногистохимической окраски необходимо заранее приготовить несколько растворов:

- Washing solution (WS) – раствор для промывки срезов
- Blocking solution (BS) – раствор для снижения фонового окрашивания
- Antibody solution (ABS) – раствор для разведения антител.

Необходимо приготовить рабочие растворы первичных и вторичных антител и подобрать наилучшее их разведение. Пилотные исследования показали, что наилучшим разведением для первичных антител является разведение 1:500, для вторичных – 1:2500. Использовались первичные мышинные антитела к α -ИФ и первичные кроличьи антитела к γ -ИФ, вторичными антителами были козы антимышинные антитела с меткой Alexa Fluor 488 (зеленый цвет метки) и козы антикроличьи антитела с меткой Alexa Fluor 555 (красный цвет метки).

Сам процесс иммуногистохимической окраски проходил в соответствии со стандартным протоколом фирмы-производителя антител для свободно-плавающих срезов (Abcam, Великобритания), перевод которого представлен в приложении (Приложение E), при этом все этапы промывки и инкубации проводились на шейкере. На этапе работы со вторичными антителами все действия проводили в затемненных условиях, чтобы избежать выгорания флуоресцентных меток.

После окраски срезы переносили на стекла с монтирующей жидкостью и раствором для контрастирования ядер (PBS, глицерин, DAPI) и помещали в холодильник до микроскопии стекол. Непосредственно перед микроскопией стекла нагревали до комнатной температуры.

2.4.3. Флуоресцентная микроскопия на системе «ZOE fluorescent Cell imager»

ZOE fluorescent Cell imager – инвертированная система визуализации, позволяющая рассмотреть препарат в фазовом контрасте и трёх каналах флуоресценции (синий, зеленый, красный), сделать фотографии и создать

совмещенное изображение препарата по всем трем каналам. Аппарат хорошо оптимизирован для наиболее широко применяемых флуоресцирующих белков и красителей, не нуждается в калибровке и установке ПО. Интерфейс интуитивно понятен, так как создан на платформе Android, что позволяет легко производить настройку яркости и контрастности для получения качественных изображений [27].

2.4.4. Обработка и анализ изображений с помощью ImageJ

ImageJ – свободное программное обеспечение (ПО) для обработки и анализа изображений в общедоступном контексте, разработанная NIH Image для Macintosh. Загружаемые дистрибутивы доступны для Windows, Mac OS X и Linux. ImageJ может отображать, редактировать, анализировать, обрабатывать, сохранять и печатать 8-битные, 16-битные и 32-битные изображения. ПО может читать многие форматы изображений, включая TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS и «raw», поддерживает серию изображений, разделяющих одно окно, является многопоточной, поэтому длительные операции, такие как чтение файла изображения, могут выполняться параллельно с другими операциями [28].

Для ImageJ существует множество дополнительных плагинов, позволяющих проводить биомедицинские исследования изображений. Так, ImageJ позволяет производить подсчет числа клеток, измерение интенсивности свечения флуоресцентной метки, анализировать колокализацию двух и более изображений, создавать совмещенные изображения и многое другое, что делает эту программу незаменимой для медико-биологических исследований.

2.4.5. Статистический анализ

Статистический анализ проводили в программе StatPlus 2006 с использованием методов непараметрической статистики (Манна-Уитни для независимых выборок и Уилкоксона для зависимых). Результаты представлены в виде диаграмм «ящик с усами», в которых представлены медиана, межквартильный размах, среднее, минимальное и максимальное значения (Приложение Ж). Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0,05$ и менее. Здесь и далее: * - p при сравнении переменных между контролем и депрессией, # - p при сравнении переменных до и после введения ИФ в контрольной группе и при депрессии, \$ - p при сравнении переменных после введения ИФ в сравнении с введением физ. раствора в контрольной группе и при депрессии. Градации уровня значимости: *, #, \$ $p \leq 0.05$; **, ##, \$\$ $p \leq 0.01$; ***, ###, \$\$\$ $p \leq 0.005$; ****, ####, \$\$\$\$ $p \leq 0.001$.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Результаты тестов

3.1.1 NSS-тест

Анализ результатов NSS-теста (рисунок 1) показал, что во всех группах животных повреждения были умеренной и средней степени выраженности, что исключает наличие выраженной неврологической симптоматики и исключает наличие других заболеваний ЦНС.

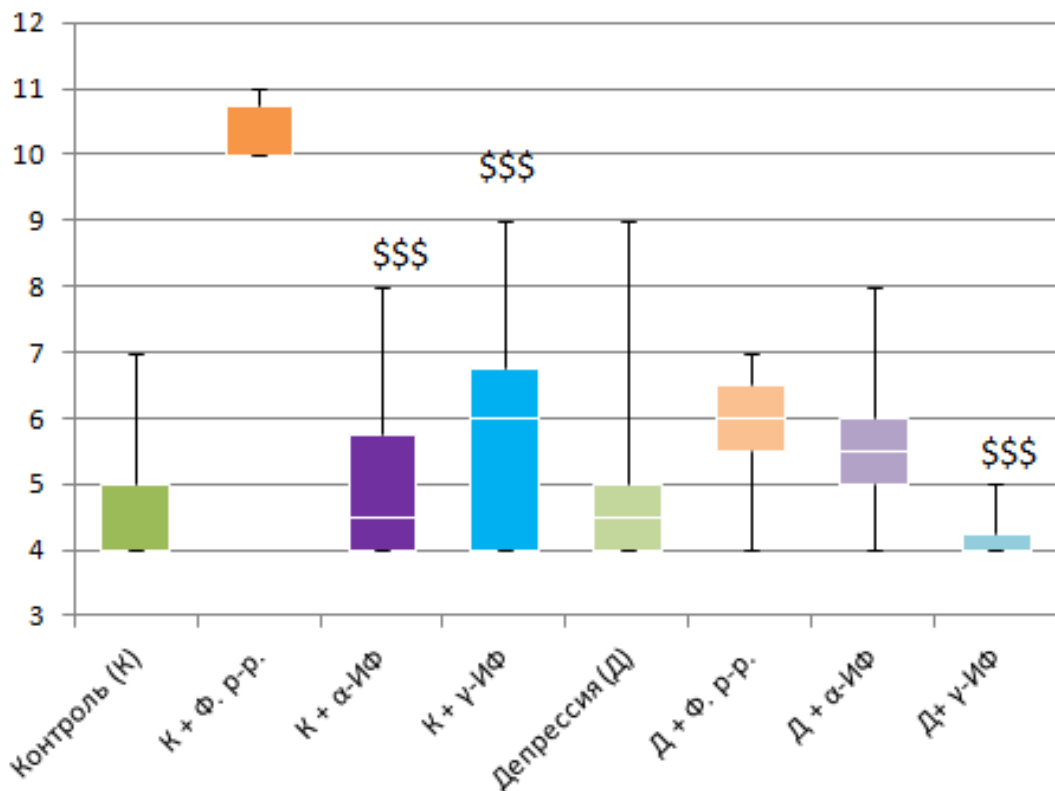


Рисунок 1 – Неврологический дефицит (сумма баллов в NSS тесте)

У животных после введения интерферонов наблюдалась тенденция к увеличению суммы баллов в тесте по сравнению с результатами в группах депрессии и контроля до введения интерферонов. Расхождения в некоторых группах в основном были связаны только с изменениями равновесия и в большей степени связано с индивидуальными особенностями животных (различия в весе, чем с наличием явно выраженного неврологического дефицита). Из графика можно заметить две резко отличающиеся группы. Группа «К+Ф.р-р.», в которой заметно увеличение количества баллов в тесте. Это можно объяснить излишним весом крысят этой группы (60-75 г, в то время как остальные животные весили 45-60 г), в результате чего им сложнее было удерживаться на балансирах. Группа «Д+γ-ИФ» показала значительно отличающиеся наименьшие результаты в тесте, что может свидетельствовать о наличии нейропротекторных эффектов γ-ИФ, что требует дальнейшего изучения на увеличенной выборке животных.

3.1.2. Гипонеофагия

Тест на гипонеофагию (число подходов к пище, рисунок 2) не выявил значимых различий в большинстве исследуемых групп животных в связи с боязнью принимать новую пищу не только у экспериментальных, но и у контрольных групп животных, что может быть связано с относительно небольшим возрастом животных (27-28 суток), в то время, как тест рассчитан на взрослых животных, которые обычно с интересом относятся к новой пище.

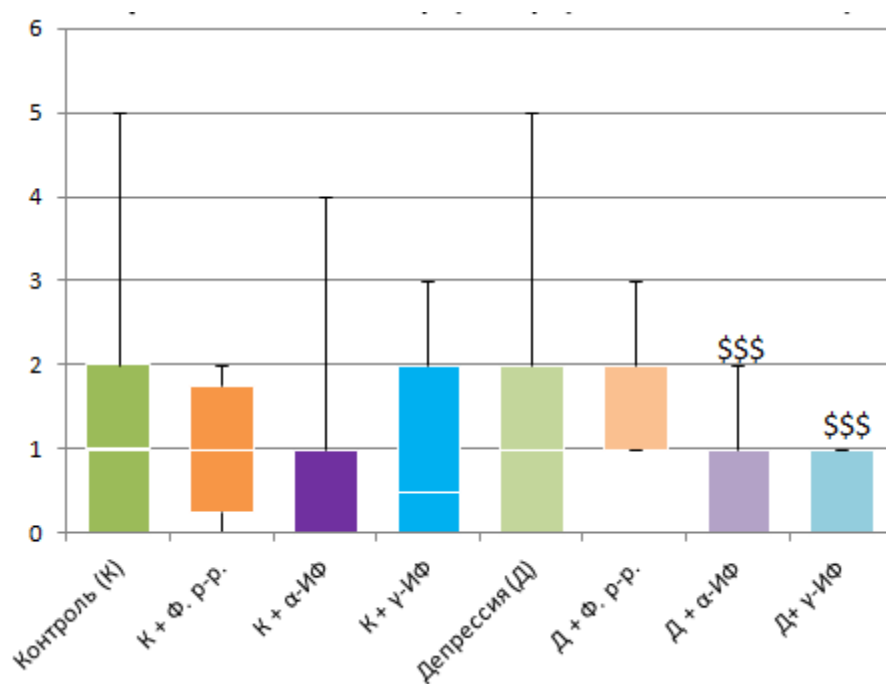


Рисунок 2 – Гипонеофагия (число подходов к пище)

Однако в группах с депрессией с введением интерферонов отмечалось значимое снижение интереса к пище, что может свидетельствовать о потенциально усугубляющем эффекте обоих видов интерферонов на развитие депрессии при стрессе раннего периода жизни и может быть использовано в дальнейшем для создания комбинированных моделей стресса раннего периода жизни (воздействие самого стресса и инъекции α - или γ -интерферона).

3.1.3. Тест «Открытое поле»

Из результатов теста видно, что после введения ИФ как в контроле, так и в группе с депрессией, отмечается значимое снижения числа эпизодов замирания, при одновременном увеличении времени замирания (рисунок 3).

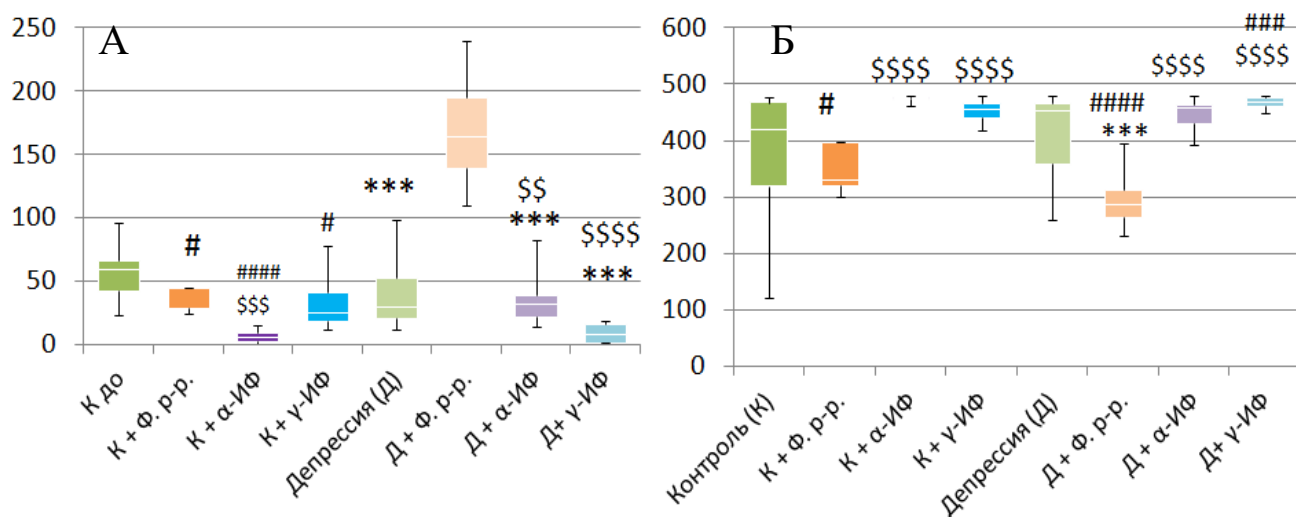


Рисунок 3 – Результаты теста «открытое поле»: А - число эпизодов замирания (эп.); Б – время замирания (с).

Для группы «Д+γ-ИФ» это может свидетельствовать об усилении депрессия-подобного поведения. Похожая ситуация наблюдается и в группе «К+γ-ИФ», но в меньшей степени, чем в группе «К+α-ИФ», в которой у животных было в большей степени выражено тревожное поведение.

Из графика, показывающего общую пройденную дистанцию в тесте (рисунок 4) можно заметить, что группа животных с депрессией, при введении α-интерферонов, также в значительной степени более подвижна, и, возможно, в большей степени подвержена тревожным состояниям, о чем свидетельствует у них увеличение пройденной дистанции.

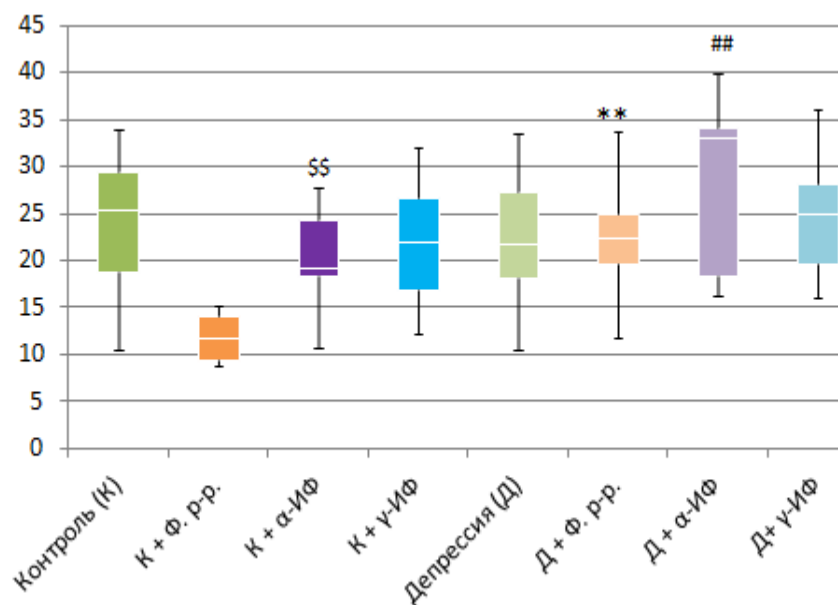


Рисунок 4 – Дистанция, пройденная животным (м) в тесте «Открытое поле»

Время исследования норок (рисунок 5) характеризует исследовательское поведение животных.

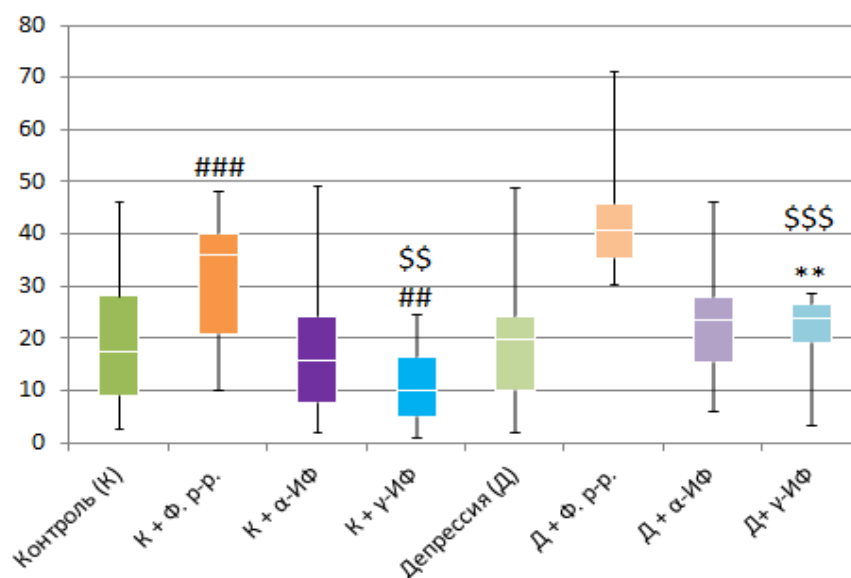


Рисунок 5 – Время исследования норок (с) в тесте «Открытое поле»

Данный тест показал вариабельность результатов, вероятнее всего, связанную с небольшим возрастом животных и неполным формированием у них исследовательского поведения. В то же время, были обнаружены значимые отличия при использовании γ -ИФ: в контроле он вызвал уменьшение исследовательского поведения, при депрессии, напротив, его увеличение.

3.1.4. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Полученные данные указывают на то, что у животных в группах контроля и с моделью депрессии происходит усиление депрессивного поведения, что проявляется в снижении времени нахождения в «стрессогенных», открытых рукавах и в центре теста и увеличении времени нахождения в «нестрессогенных», закрытых рукавах (рисунок 6).

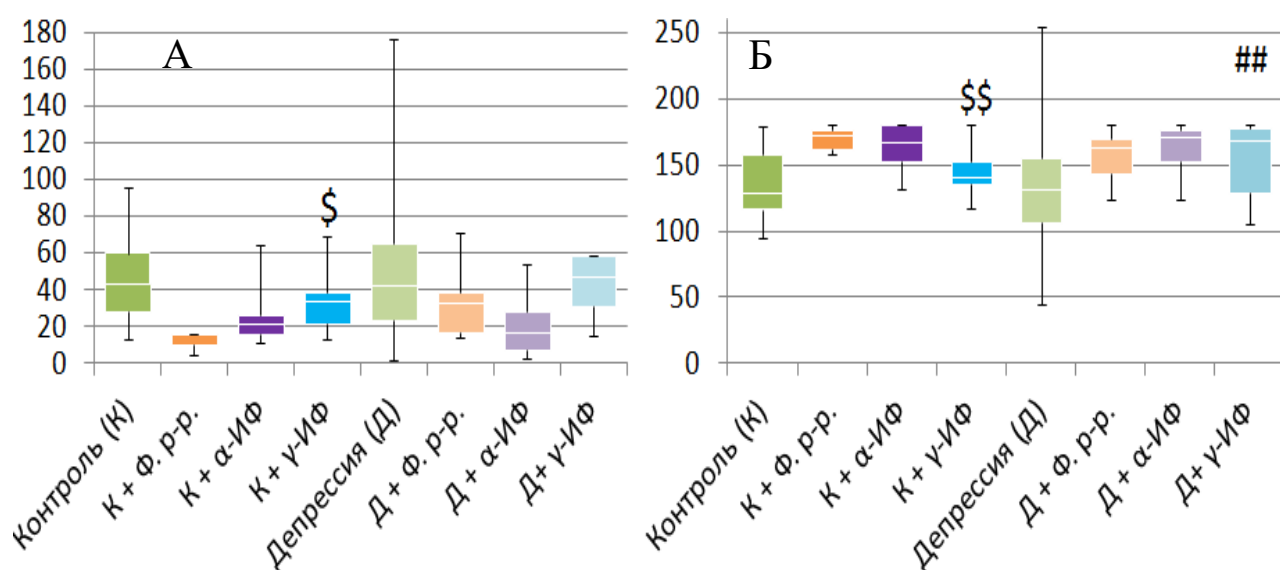


Рисунок 6 – Результаты теста «ПКЛ»: А – Время, проведенное в

открытых рукавах ПКЛ; Б – Время, проведенное в закрытых рукавах ПКЛ (с)

Так, при введении ИФ отмечается снижение времени, проведенного в открытых рукавах и одновременное увеличение времени, проводимого в закрытых рукавах теста.

Однако данные, касающиеся влияния γ -ИФ на поведение животных в тесте, несколько противоречивы. Так, в группе «Д+ γ -ИФ» отмечается значимое увеличение времени, проводимого крысами в закрытых рукавах, однако общая подвижность животных в тесте и интенсивность исследовательского поведения, которое можно охарактеризовать частотой посещения животным центральной части теста (рисунок 7), могут свидетельствовать о том, что γ -ИФ оказывает менее угнетающее действие на ЦНС, нежели α -ИФ.

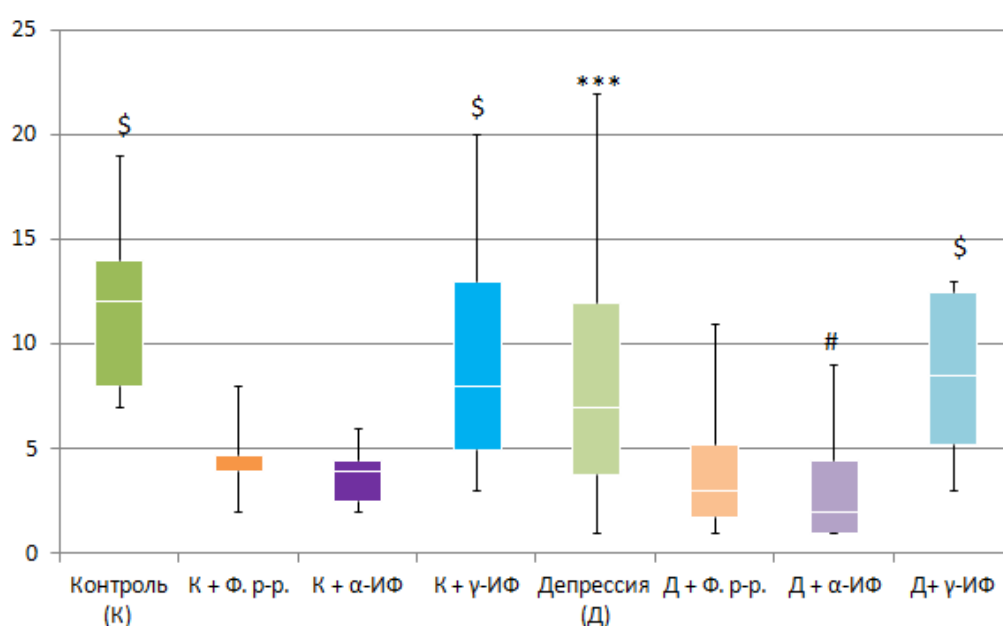


Рисунок 7 – Число заходов в центр теста «ПКЛ»

3.2. Результаты иммуногистохимии

3.2.1. Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к α -ИФ и площадь экспрессии рецепторов

Результаты, полученные при обработке изображений при флуоресцентной микроскопии, свидетельствуют о значимом увеличении числа клеток, экспрессирующих рецепторы к α -ИФ в группе «Д+Ф.р-р.» в гиппокампе, по сравнению с группой «К+ Ф.р-р.», и о значимом снижении процента экспрессирующих клеток в группе «Д+ α -ИФ» в гиппокампе и миндалине (рисунок 8). Такой результат может свидетельствовать о блокировке рецепторов к α -ИФ при их экзогенном введении, либо о дисфункции рецепторов, вызванной развитием депрессии.

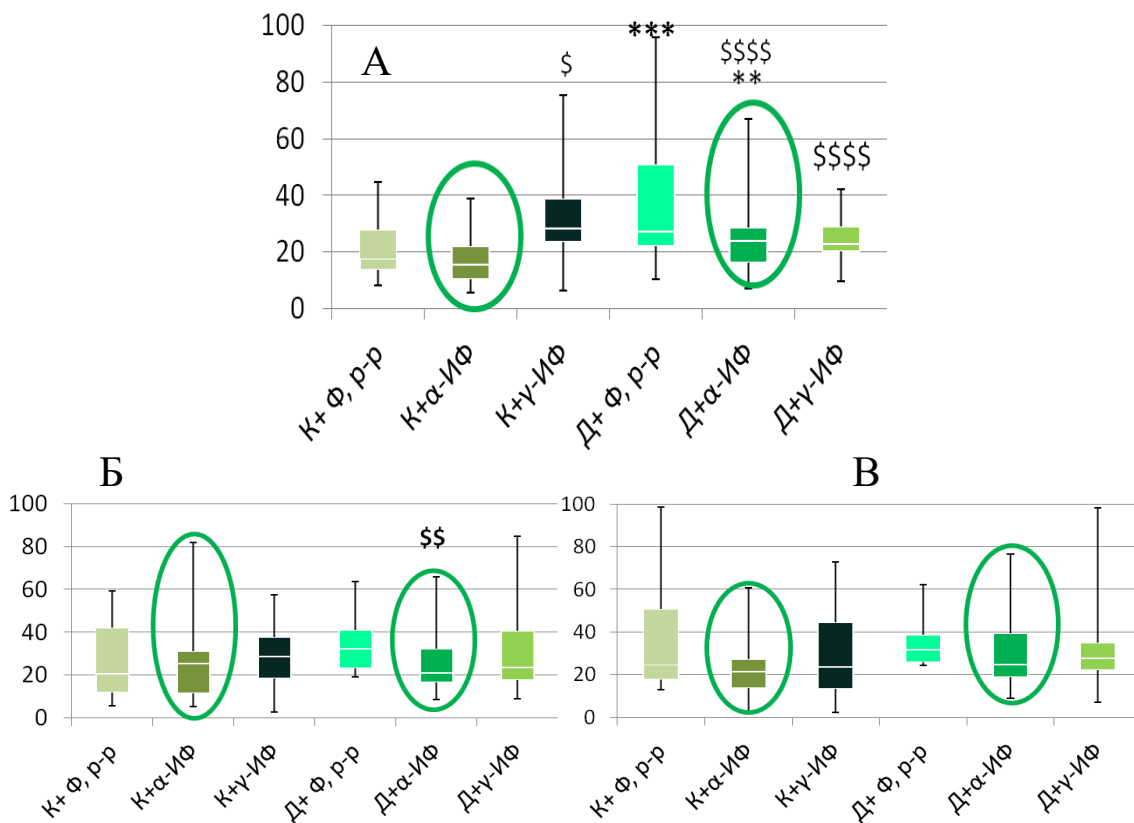


Рисунок 8 – Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к α -ИФ в различных регионах головного мозга: А – Гиппокамп, Б - Миндалина; В – Энторинальная кора

Интересно, что в группе «K+ γ -ИФ», отмечается увеличение числа клеток, экспрессирующих рецепторы к α -ИФ, что может свидетельствовать о плейотропных эффектах γ -ИФ.

Данные по площади экспрессии рецепторов к α -ИФ, в целом, сходятся с данными по процентному количеству клеток, экспрессирующих данные рецепторы (рисунок 9).

Отмечено что в группе «Д+ α -ИФ» во всех областях мозга происходит значимое снижение площади экспрессии, однако можно заметить, что в некоторых группах наблюдается большой разброс данных. В миндалине в группе «Д+ γ -ИФ» наблюдается значимое увеличение площади, но с так же с большим разбросом данных.

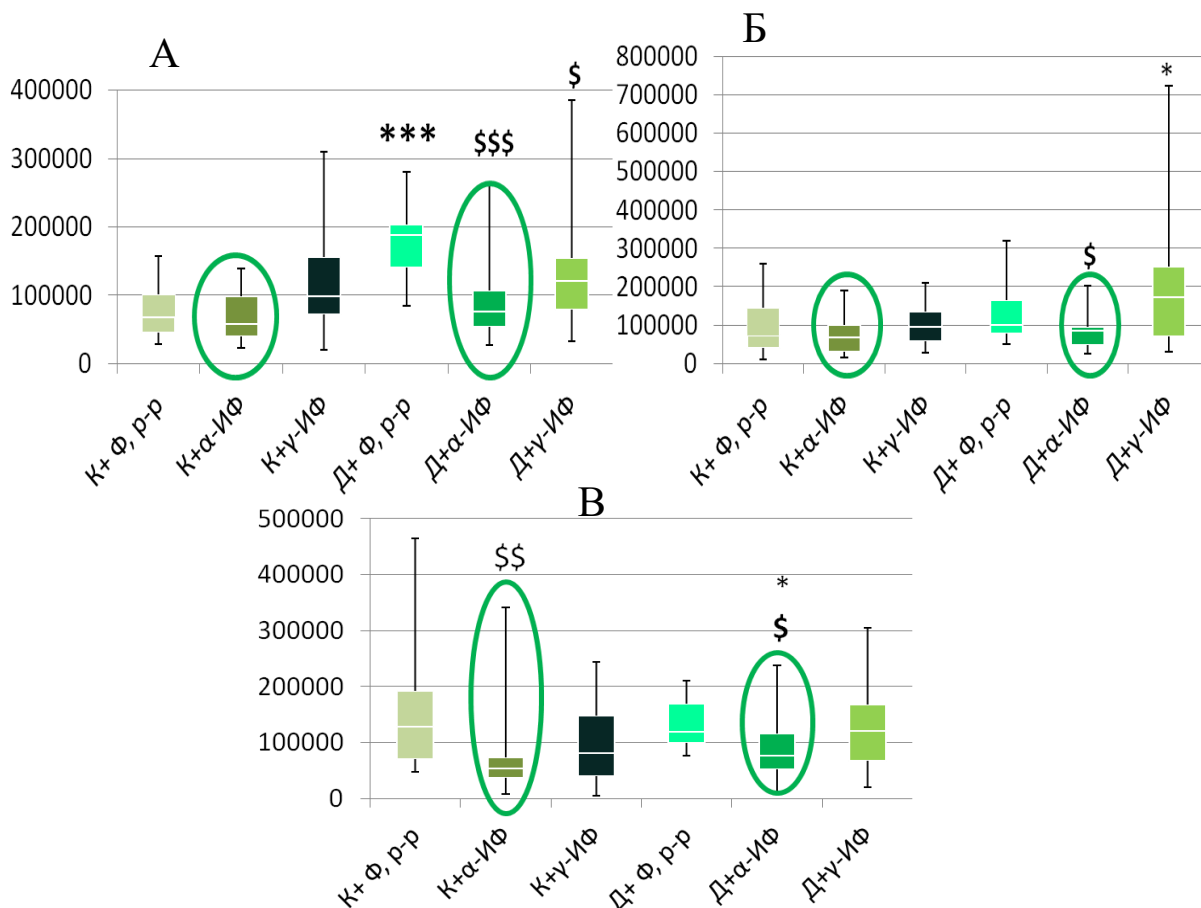


Рисунок 9 – Площадь экспрессии рецепторов к α -ИФ в различных регионах головного мозга: А – Гиппокамп, Б - Миндалина; В – Энторинальная кора

3.2.2. Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к γ -ИФ и площадь экспрессии рецепторов к γ -ИФ

Из графиков заметно (рисунок 10), что, как и в случае с α -ИФ, экспрессия рецепторов к γ -ИФ значительно возрастает в группе «Д+Ф.р.р.» в гиппокампе и миндалине, также в группе «К+ γ -ИФ» отмечено значимое увеличение экспрессии рецепторов в гиппокампе и тенденция к увеличению в остальных областях мозга.

В то же время, в группе с моделью депрессии отмечается значимое снижение процента экспрессирующих клеток в гиппокампе, что также можно объяснить блокировкой рецепторов.

Замечена тенденция к увеличению экспрессии рецепторов к γ -ИФ, в контрольной группе с введением α -ИФ и снижения этого показателя в группе с депрессией. Можно объяснить это как плеiotропным эффектом α -ИФ, возможной активацией рецепторов излишним количеством γ -ИФ.

Данные о площади экспрессии, как и в случае с α -ИФ, совпадают по характеру распределения с процентом экспрессирующих клеток (рисунок 11).

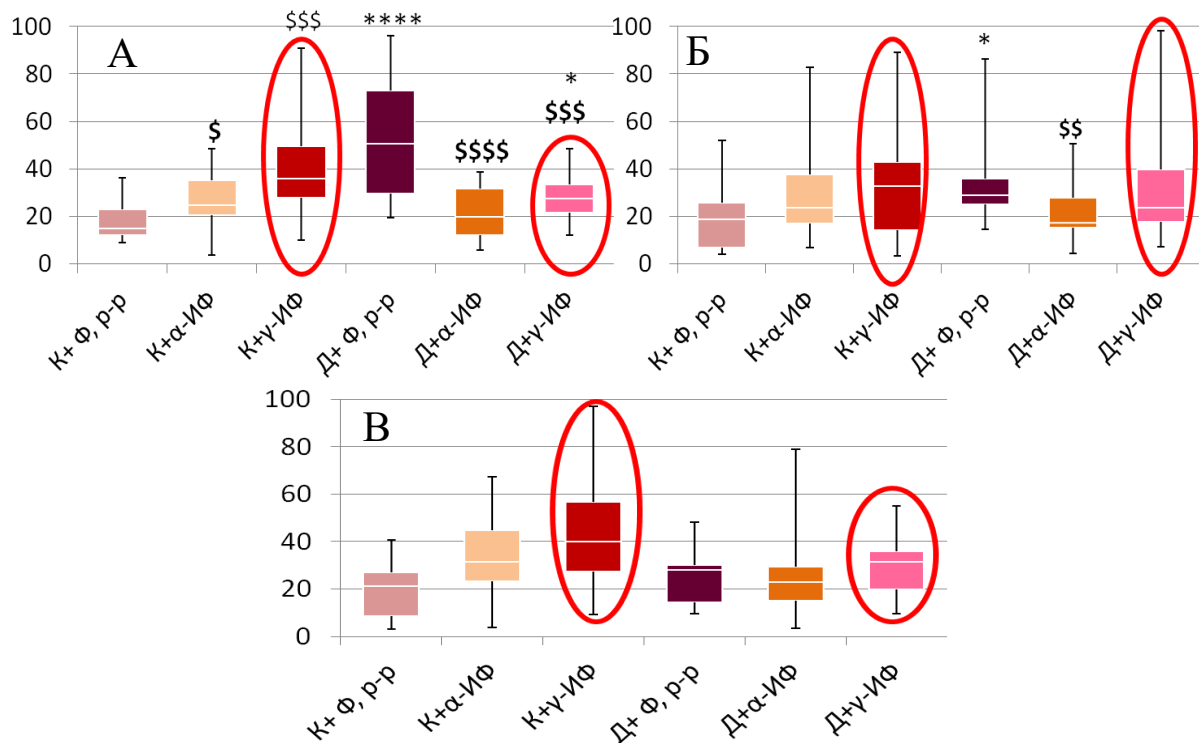


Рисунок 10 – Процент клеток, экспрессирующих рецепторы к γ -ИФ в различных регионах головного мозга: А – Гиппокамп; Б – Миндалина; В – Энторинальная кора

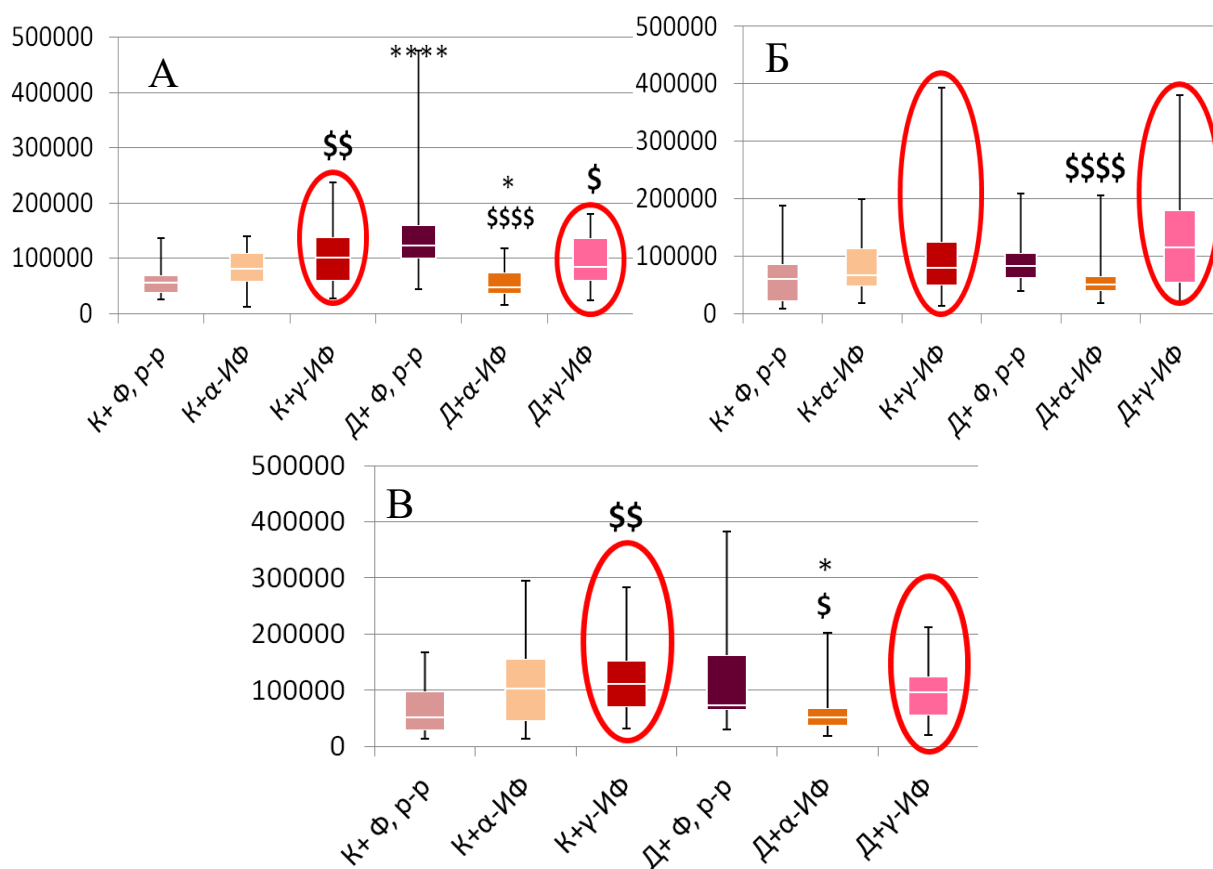


Рисунок 11 – Площадь экспрессии рецепторов к γ -ИФ в различных регионах головного мозга: А – Гиппокамп; Б – Миндалина; В – Энторинальная кора

Имеется небольшое различие в миндалях: при депрессии с введением γ -ИФ заметно незначительное увеличение площади экспрессии, по сравнению с группой «Д+Ф-р.р.».

Таким образом, при введении интерферонов обнаружены следующие эффекты на экспрессию рецепторов к интерферонам:

- Снижение экспрессии рецепторов к α -ИФ, при их введении в контроле и депрессии, при одновременном усилении экспрессии при введении γ -ИФ;
- Экспрессия рецепторов к γ -ИФ увеличивается в контроле и снижается в группах с депрессией, при этом так же происходит увеличение процента экспрессирующих клеток в контроле при введении α -ИФ;
- Таким образом ИФ могут оказывать плеiotропные эффекты и при их избыточности активировать рецепторы других интерферонов, а так же при депрессии снижение экспрессии может быть вызвано блокировкой рецепторов.

Заключение

Таким образом, влияние ИФ на организм животного в большей степени интересно с точки зрения создания комбинированных моделей депрессии, в связи с усилением стрессогенности даже при их однократном применении.

Были сделаны следующие выводы:

1. Во всех группах животных повреждения были умеренной и средней степени выраженности, что исключает наличие выраженной неврологической симптоматики.
2. В отношении принятия новой пищи крысами с моделью депрессии и без нее с действием интерферонов и без них не было выявлено выраженных различий.
3. Стрессогенность крыс в тестах «Открытое поле» и «ПКЛ» в виде тревожности/гиперактивности и/или заторможенности была выражена почти во всех группах при депрессии в сравнении с контрольными группами (резко уменьшено или увеличено время замирания, увеличено или снижено время пребывания в «стрессогенных» открытых и «нестрессогенных» закрытых рукавах, снижено или увеличено число заходов в центр).
4. При действии ИФ усилена стрессогенность крыс после однократного введения как в контроле, так и при депрессии, более выраженное при введении α -ИФ, γ -ИФ в некоторых случаях при депрессии оказывает нейропротективный эффект (снижение неврологического дефицита), однако в большинстве случаев также усиливает стрессогенность крыс, что требует дальнейшего изучения.
5. В отношении числа клеток, экспрессирующих рецепторы к интерферонам и площади их экспрессии, получены схожие изменения: значимое снижение экспрессии рецепторов к α -ИФ во всех регионах головного мозга при действии α -ИФ и значительное γ -ИФ заметно увеличение экспрессии рецепторов к α -ИФ при действии γ -ИФ, что может быть связано с дисрегуляцией сигнальных путей, связанных с интерферонами, при их экзогенном введении и о неспецифическом характере действия или плейотропных эффектах при коротком приложении интерферонов.

Список сокращений

БА – болезнь Альцгеймера
БР – биполярное расстройство
ГС – гепатит С
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
Д – группа с моделью депрессии
ИСГ – интерферон-стимулирующих генов
ИДО – индоламина 2,3-диоксигеназа
ИФ – интерферон
К – контрольная группа
КИН – кинуреин
ОП – открытое поле
ПДК – плазмоцитоподобные дендритные клетки
ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт
ПО – программное обеспечение
СМЖ – спинномозговая жидкость
ТРП – триптофан
ЦНС – центральная нервная система
ХК – хинолиновая кислота
ЭК – энторинальная кора
ABS – antibody solution
BS – blocking solution
WS – washing solution

Литература

1. Lotrich, F.E. Major depression during interferon- treatment: vulnerability and prevention. / F.E. Lotrich // *Dialogues in Clinical Neuroscience* – 2009. - Vol. 11(4).
2. Reyes-Vázquez, C. Interferon modulates central nervous system function. / C. Reyes-Vázquez, B. Prieto-Gómez, N. Dafny // *Brain research* – 2012. - Vol. 1442. - P. 76-89.
3. Type-1 interferon signaling mediates neuro-inflammatory events in models of Alzheimer's disease. / J.M. Taylor, M.R. Minter, A.G. Newman et al. // *Neurobiology of aging*. - 2014. - P. 1012-1023.
4. The choroid plexus transcriptome reveals changes in type I and II interferon responses in a mouse model of Alzheimer's disease. / S.D. Mesquita, A.C. Ferreira, F. Gao et al. // *Brain behavior, and immunity*. - 2015.
5. Эффекты гамма-интерферона при экспериментальной ишемии головного мозга *in vivo* и *in vitro* / Э.Д. Гасымлы, Ю.А. Панина, О.В. Баглаева, А.С. Базарова // II Международная научно-практическая конференция Актуальные вопросы медицины.- Баку, Общественная организация "Молодые врачи Азербайджана". - 2013. - С. 84-85.
6. Interferon- β 1a modulates glutamate neurotransmission in the CNS through CaMKII and GluN2A-containing NMDA receptors. / M. Di Filippo, A. Tozzi, S. Arcangeli et al. // *Neuropharmacology*. - 2016. - Vol. 100. - P. 98-105.
7. Interferon-alpha treatment induces depression-like behaviour accompanied by elevated hippocampal quinolinic acid levels in rats. / C. Weide Fischer, A. Eskelunda, D.P. Budac et al. // *Behavioural Brain Research*. - 2015. - P. 166-172.
8. Mechawar, N. Neuropathology of mood disorders: do we see the stigmata of inflammation? / N. Mechawar, J. Savitz // *Translational Psychiatry* – 2016. – Vol. 6.
9. Type I interferon response in the central nervous system. / S. Paul, C. Ricour, C. Sommereyns et al. // *Biochimie*. – 2007. – Vol. 89(6). – P. 770-778.
10. Antiviral type I and type III interferon responses in the central nervous system. / F. Sorgeloos, M. Kreit, P. Hermant et al. // *Viruses*. – 2013. – Vol. 5(3). – P. 834-857.
11. Interferon- γ safeguards blood-brain barrier during experimental autoimmune encephalomyelitis. / C. Ni, C. Wang, J. Zhang et al. // *The American Journal of Pathology*. – 2014. – Vol. 184(12). – P. 3308-3320.
12. Interferon- γ mediated signaling in the brain endothelium is critical for inflammation-induced aversion. / M. Fritz, A.M. Klawonn, M. Jaarola, D. Engblom // *Brain, behavior, and immunity*. – 2018. – Vol. 67. – P. 54-58.
13. Herman, J.P. Stress response: neural and feedback regulation of the HPA axis. / J.P. Herman // *Stress Science: Neuroendocrinology*. – 2010. – Vol. 75.
14. Fröhlich, F. *Network neuroscience*. – Academic Press, 2016. – P. 97-109.
15. Morrissey, M.D. Diversity of mnemonic function within the entorhinal cortex: a meta-analysis of rodent behavioral studies / M.D. Morrissey, K. Takehara-Nishiuchi // *Neurobiology of learning and memory*. – 2014. – Vol. 115. – P. 95-107.

16. Increased amygdala responses to emotional faces after psilocybin for treatment-resistant depression. / L. Roseman, L. Demetriou, M.B. Wall et al. // *Neuropharmacology*. – 2017.
17. Maternal separation alters maternal care, but has minor effects on behavior and brain opioid peptides in adult offspring. / M. Marmendal, E. Roman, C.J. Eriksson et al. // *Developmental psychobiology*. – 2004. – Vol. 45(3). – P. 140-152.
18. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. / Я. Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон – Москва: Высшая школа, 1991. – 399 с.
19. Deacon, R.M.J. Hyponeophagia: A Measure of Anxiety in the Mouse / R.M.J. Deacon // *J. Visualized Experiments* – 2011. – Vol. 51.
20. Видеотрекинг для исследования поведения животных (сравнительный обзор) [Электронный ресурс]: – Режим доступа: <http://www.openscience.ru/article.php?num=009>
21. Система видеонаблюдения за поведением лабораторных животных с автоматической сегментацией на поведенческие акты / А.С. Конушин, Д.П. Ветров, П.А. Воронин и др. - М.: МГУ, ВЦ им. А.А. Дородницына РАН.
22. Any-maze behavioural tracking software [Электронный ресурс]: Any-maze Features. – Режим доступа: <http://www.anymaze.co.uk/anymaze-features.htm>
23. Чубаров, И.Ю. Полуавтоматическая методика регистрации пространственного местоположения животных в условиях свободного поведения / И.Ю. Чубаров // *Современные проблемы науки и образования*. – 2013. – № 3.
24. Микротехника: практикум / сост. И. П. Комарова; Яросл. гос. ун-т им. П. Г. Демидова. – Ярославль : ЯрГУ, 2013. – 60 с.
25. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях: учебное пособие для системы медицинского и фармацевтического послевузовского образования / ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачев. – М.: Профиль, 2010 – 358с.
26. Aikawa E. *Immunohistochemistry* – Elsevier, 2011.
27. The ZOE Fluorescent Cell Imager [Электронный ресурс]: – Режим доступа: <http://www.bio-rad.com/ru-ru/product/zoe-fluorescent-cell-imager>
28. ImageJ [Электронный ресурс]: ImageJ Features: – Режим доступа: <https://imagej.nih.gov/ij/features.html>

Приложение А. Дизайн эксперимента



Приложение Б. Создание модели стресса раннего периода жизни

Модель стресса раннего периода жизни

(по методу Marmendal M. et al., 2004; Uhelski M.L., Fuchs P.N., 2010; Яузиной Н.А. и др., 2013)



Со 2 по 15-й дни от рождения:
ежедневное 3-часовое
отлучение крысят от
матери



Приложение В. Протокол NSS-теста

Протокол оценки	Значения у тестируемой крысы (обвести нужное)	Макс. число баллов
Оценка моторной функции Подвешивание крысы за хвост: 1 – сгибание передней лапы 1 – сгибание задней лапы 1 – отклонение головы более чем на 10 градусов от вертикальной оси в течение 30 сек	0 1 2 3	3
Помещение крысы на пол: 0 – нормальное движение по полу 1 – неспособность сохранять направленное движение 2 – движение по кругу в сторону паретичных конечностей 3 – падение на паретичную сторону	0 1 2 3	3
Оценка сенсорной функции: 1 – укладывание (зрительный и тактильный тесты) 1 – проприоцептивный тест (придавливание лапки к краю стола)	0 1 2	2
Отсутствие рефлексов или патологическая двигательная активность		4
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 щелкани зажима для бумаги)	0 1	1
1 – судороги, миоклонус, миодистония.	0 1	1
Оценка равновесия: 0 – сохранение равновесия и стабильное положение тела 1 – захватывание балансира 2 – крепкое сжатие балансира и отвисание одной паретичной конечности вдоль балансира 3 – крепкое сжатие балансира и отвисание двух паретичных конечностей вдоль балансира, или кружение на балансире (более 60 сек) 4 – попытка сохранить равновесие на балансире (более 40 сек), но падение с него 5 – попытка сохранить равновесие на балансире (менее 40 сек), но падение с него 6 – падение без попытки балансировать или ухватиться за балансир (менее 20 сек)	0 1 2 3 4 5 6	6
Итоговое количество баллов		18

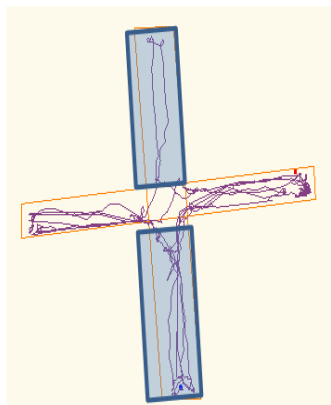
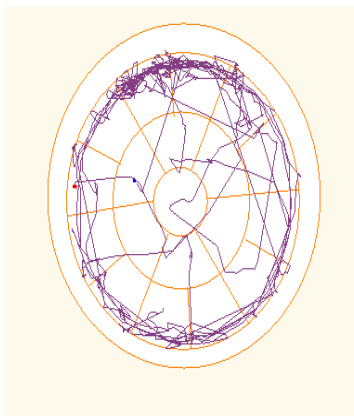
Сумма баллов в тесте:

13-18 – выраженное повреждение;

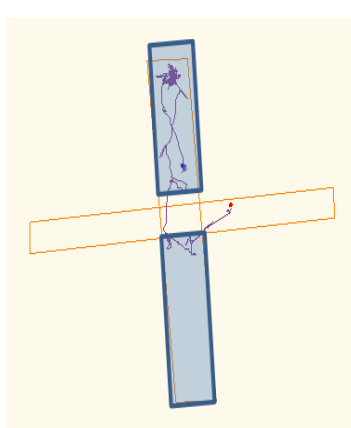
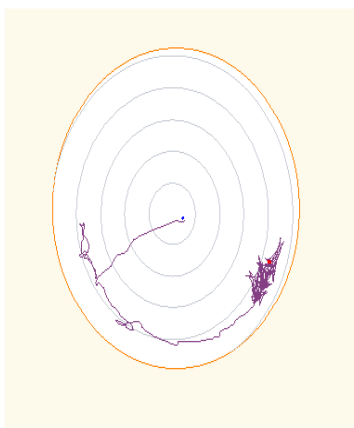
7-12 – повреждение средней степени тяжести;

1-6 – умеренное повреждение

Приложение Г. Примеры нормального и депрессия-подобного поведения в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт»

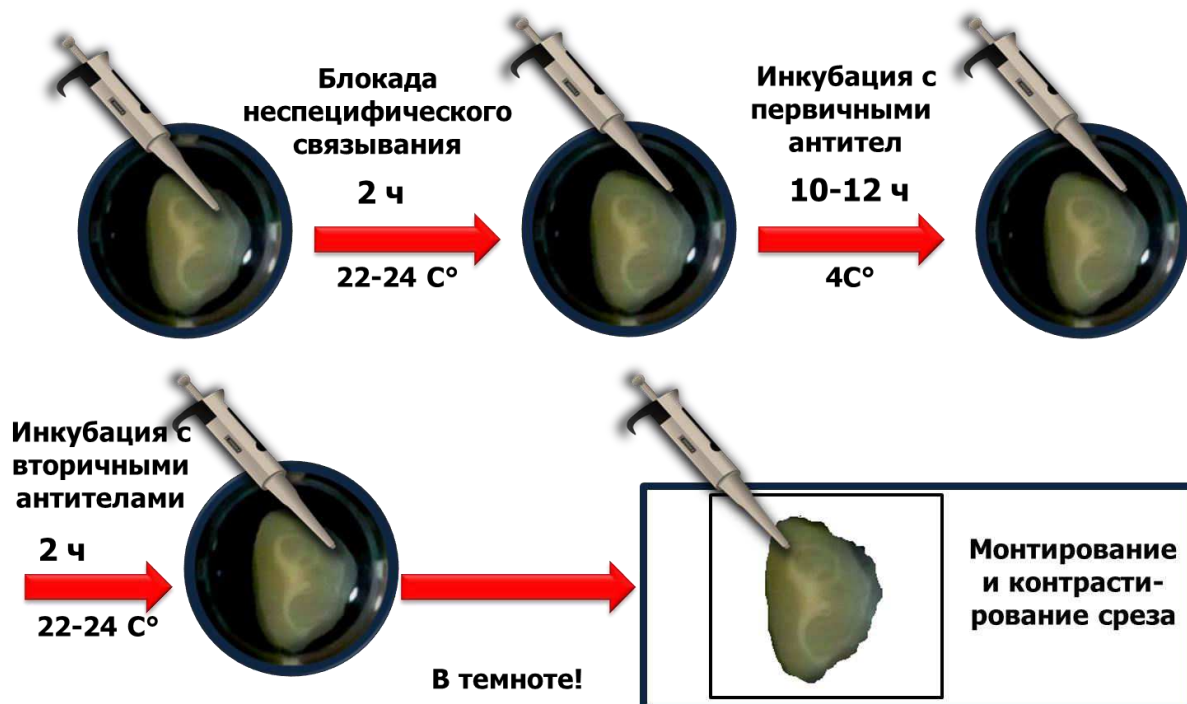
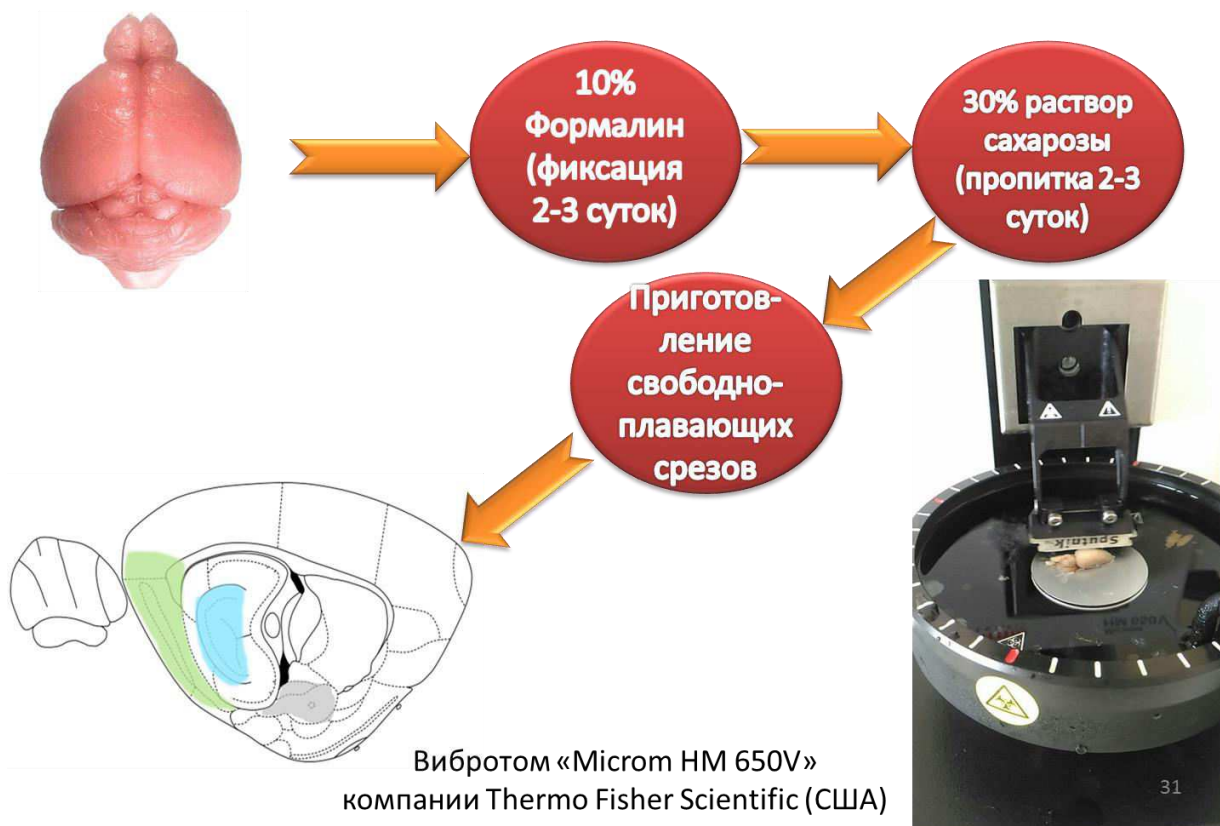


Примеры нормального поведения в тестах ОП и ПКЛ



Примеры депрессивного поведения в тестах ОП и ПКЛ

Приложение Д. Подготовка биологического материала к иммуногистохимии и ее основные этапы



На всех этапах осуществляли 2-3-кратную промывку образцов 5-минутной инкубацией с раствором Washing solution!

Приложение Е. Протокол иммуногистохимии на свободно-плавающих срезах (Abcam, Великобритания)

Все этапы инкубации и промывки необходимо проводить на шейкере, ИГХ проводилась в 24-луночных планшетах, для инкубации с антителами использовалось по 200 мкл раствора с антителами, для остальных этапов - по 400 мкл растворов:

1. Если срезы находились в консерванте, то необходимо провести три промывки в WS по 5 минут;
2. Инкубировать 1 час в BS при комнатной температуре (блокирование неспецифического связывания);
3. Три промывки по 5 минут в WS;
4. Ввести первичные антитела и поставить инкубироваться на ночь в холодильник;
5. На следующий день доинкубировать срезы при комнатной температуре 2 часа;
6. Повторить п. 3.
7. Ввести вторичные антитела и инкубировать 2 часа при комнатной температуре в затемненном помещении;
8. Повторить п. 3.
9. Перенос срезов на стекла с нанесением монтирующей жидкости.

Разведение растворов

1. Washing solution (WS): 200 мл PBS + 400 мкл 0.2% Triton X100 (разведение на шейкере);
2. Antibody solution (ABS): 100 мкл 0.2% Triton X100 + 6 мл 25% BSA + 50мл PBS (разведение на шейкере) или Washing solution + 6 мл 25% BSA;
3. Blocking solution (BS): 500 мкл 1% Triton X100 + 6 мл 25% BSA + 50мл PBS (разведение на шейкере)
4. Монтирующая жидкость: PBS+ глицерин (1:1) + DAPI

Приложение Ж. Интерпретация диаграмм «ящик с усами»

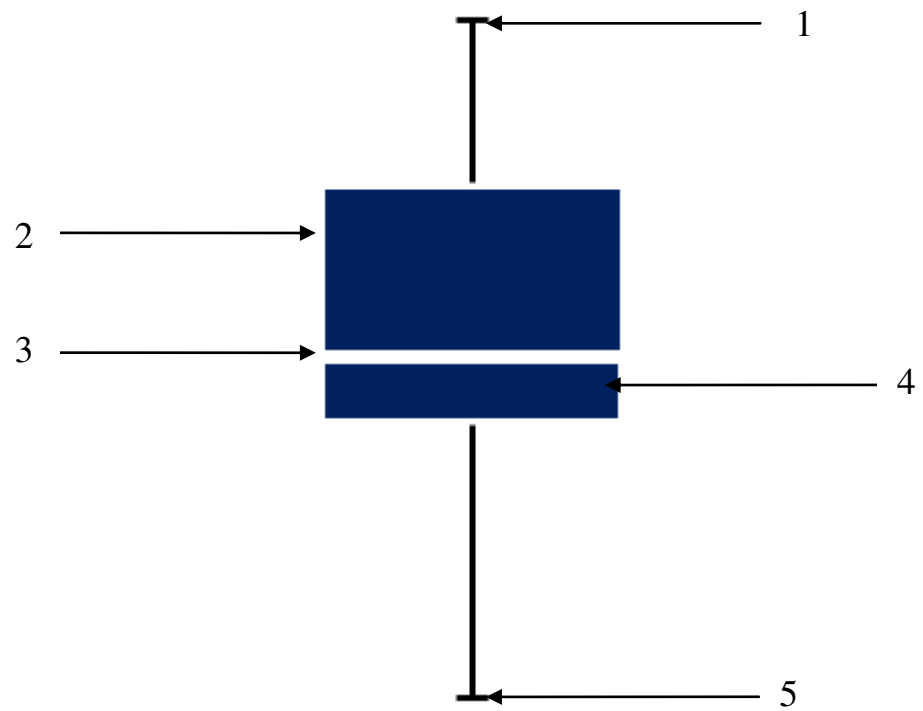
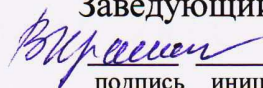


Рис. Интерпретация графиков: 1 – максимальное значение; 2 – Q3 квартиль; 3 – медиана; 4 – Q1 квартиль; 5 – минимальное значение.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись инициалы, фамилия
« 9 » 06 20 18 г.

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология
06.03.01.07 Биофизика

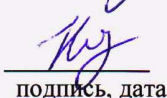
Влияние α и γ -интерферонов на интегративные функции крыс при
депрессии

Научный руководитель


подпись, дата

к.ф.-м.н А.Н. Шуваев
ученая степень инициалы, фамилия

Научные консультант


подпись, дата

д.м.н Н.А. Малиновская
ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник ББ14-01 Б


подпись, дата

К.В. Смирнова
инициалы, фамилия

Красноярск 2018