

Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом по фактору некроза опухоли

Д.В. Фурсенко¹, Н.В. Хоцкин¹, В.А. Куликов², А.В. Куликов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт автоматики и электрометрии Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Фактор некроза опухоли (ФНО) – это цитокин, обладающий как патологической, так и гомеостатической функцией в центральной нервной системе (ЦНС). Показано участие ФНО в механизме таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и рассеянный склероз. Тем не менее роль ФНО в ЦНС в нормальных физиологических условиях изучена слабо. В Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН группой С.А. Недоспасова была создана линия мышей с нокаутом по ФНО (TNFKO) на основе генома линии C57Bl/6 (WT). В нашей работе мы сравнивали поведение половозрелых самцов TNFKO и WT в стандартной батарее тестов, включающей «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «принудительное плавание». Мы показали, что дефицит ФНО не влияет на двигательную активность и исследовательское поведение мышей в тесте «открытое поле». Тем не менее в этом тесте мыши TNFKO больше времени проводили в центре арены по сравнению с мышами WT, но при этом имели выше уровень дефекаций и ниже длительность стоек. Этот результат свидетельствует о том, что легкий стресс в тесте «открытое поле» скорее дезориентирует мышей TNFKO, чем вызывает у них тревогу. Не было обнаружено различий по выраженности тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» и депрессивно-подобного поведения в тесте «принудительное плавание» между мышами этих линий. Полученные данные позволяют предположить, что отсутствие данного цитокина влечет за собой изменения в нейрофункциональных взаимодействиях, что приводит к изменению у мышей ответа на легкий стресс в тесте «открытое поле».

Ключевые слова: фактор некроза опухоли; нокаутные мыши; открытое поле; приподнятый крестообразный лабиринт; принудительное плавание.

Behavioral phenotyping of mice deficient for tumor necrosis factor

D.V. Fursenko¹, N.V. Khotskin¹, V.A. Kulikov², A.V. Kulikov¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Automation and Electrometry SB RAS, Novosibirsk, Russia

The tumor necrosis factor (TNF) is a cytokine exerting both homeostatic and pathophysiological roles in the central nervous system (CNS). It has been demonstrated that TNF plays roles in such diseases as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis. Nevertheless, the role of TNF in the CNS under normal physiological conditions is poorly studied. A novel mouse strain with TNF deficiency (TNFKO) was developed in S.A. Nedospasov's laboratory of Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences on the C57Bl/6 (WT) background. In our study, we compared the behavior of TNFKO and WT adult mice in a battery of tests: open-field, elevated plus-maze and the forced-swim test. We showed that TNF deficiency had no effect on locomotor activity or exploration in the open-field test. At the same time, in this test, TNFKO mice spent more time in the center of the arena, but had a higher level of defecation and lower rearing duration. This result indicates that, in the open-field conditions, TNFKO mice show disorientation rather than anxiety-like behavior. There were no differences between TNFKO and WT in anxiety level in the elevated plus-maze test or in depressive-like behavior in the forced-swim test. These data suggest that TNF deficiency leads to changes in neurofunctional interactions that alter the mouse response to mild stress in the open-field test.

Key words: tumor necrosis factor; knockout mice; open-field; elevated plus-maze; forced-swim test.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Фурсенко Д.В., Хоцкин Н.В., Куликов В.А., Куликов А.В. Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом по фактору некроза опухоли. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):394-398. DOI 10.18699/VJ15.050

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Fursenko D.V., Khotskin N.V., Kulikov V.A., Kulikov A.V. Behavioral phenotyping of mice deficient for tumor necrosis factor. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):394-398. DOI 10.18699/VJ15.050

DOI 10.18699/VJ15.050

УДК 577.21:57.02

Поступила в редакцию 07.06.2015 г.

Принята к публикации 04.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: dvfursenko@outlook.com; v_kulikov@bionet.nsc.ru

Фактор некроза опухоли (ФНО) – это белок, относящийся к группе провоспалительных цитокинов, выполняющий различные функции в организме (Bradley, 2008; Kaster et al., 2012; Montgomery, Bowers, 2012). ФНО на периферии организма синтезируется преимущественно активированными макрофагами и Т-лимфоцитами (Bradley, 2008), в центральной нервной системе – резидентными иммунными клетками, микроглией, астроцитами, а также клетками некоторых нейрональных популяций (Li et al., 2008; McCoy, Tansey, 2008). ФНО участвует в защите организма от бактериальных, вирусных и паразитических инфекций (Bradley, 2008), а также вместе с интерлейкином-1 и интерлейкином-6 обуславливает синдром больного при воспалительных процессах (Dantzer, 2001). Помимо участия в ответе на патогены, ФНО играет роль в развитии и формировании центральной нервной системы, в синаптической передаче, нейрогенезе во взрослом организме (Montgomery, Bowers, 2012). Кроме того, ФНО представляет интерес в качестве мишени для фармакологического воздействия при таких заболеваниях, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и рассеянный склероз (Montgomery, Bowers, 2012).

Нокаут животных по какому-либо гену является удобной моделью для изучения роли продукта этого гена в жизнедеятельности организма. В настоящее время существует несколько линий мышей с нокаутом по фактору некроза опухоли (Pasparakis et al., 1996; Körner et al., 1997; Marino et al., 1997). Одна из таких линий была создана группой С.А. Недоспасова специфическим удалением 3-го и 4-го экзонов. Было показано, что у мышей данной линии полностью отсутствуют Пейеровы бляшки, в то время как у мышей других линий с дефицитом по ФНО Пейеровы бляшки присутствуют, хотя их количество сокращено (Kuprash et al., 2005). Несмотря на то что данная линия активно используется для изучения роли ФНО на периферии (Drutskaya et al., 2005; Schioppa et al., 2011), центральное действие ФНО в свободных от патогенов условиях у таких мышей не изучалось. И хотя существуют работы, в которых изучалось поведение мышей с нокаутом по ФНО (Yamada et al., 2000; Golan et al., 2004; Samaga et al., 2013), поведенческое фенотипирование данной линии является необходимым этапом для дальнейших исследований этих животных.

Целью данной работы было изучение двигательной активности, тревожности и депрессивно-подобного поведения у мышей с нокаутом по ФНО. Для этого проводили сравнения в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «принудительное плавание» мышей дикого типа, C57BL/6 (WT), и с нокаутом гена ФНО (TNFKO).

Материалы и методы

Животные

Исследования проводили в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) на половозрелых самцах мышей с нокаутом по фактору некроза опухоли (TNFKO) (Kuprash et al., 2005) ($n = 12$)

и мышцах линии C57BL/6 (WT) ($n = 12$), на основе которой был получен данный нокаут. Все животные были в возрасте от 3 до 4 мес. и имели массу 27 ± 2 г. С момента отсадки от матерей мыши содержались в группах по 6 особей в индивидуально вентилируемых клетках (Techniplast, Италия) при регулируемом световом цикле (14:10, рассвет в 1:00, закат в 15:00), температуре 22°C и влажности воздуха 60 %. Животным был предоставлен свободный доступ к корму и воде. За два дня до эксперимента животных рассаживали в отдельные клетки того же размера для снятия группового эффекта. Все процедуры тестирования начинались в 15:30. Содержание и тестирование животных проводили в соответствии с Инструкцией по содержанию и использованию лабораторных животных (NIH Publication N 80–23, США) и были одобрены комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН.

Тестирование поведения

Для тестирования поведения использовали программно-аппаратный комплекс EthoStudio, разработанный в ФГБУН «Институт автоматизации и электрометрии СО РАН». Данный комплекс включал в себя стенд для установки арен, освещение и цифровой 3D сенсор Kinect (Microsoft), присоединенный к компьютеру через USB-интерфейс. Этот сенсор позволяет одновременно получать обычные 2D и 3D изображения животного (Kulikov et al., 2014). В тестах «открытое поле» и «принудительное плавание» источник света помещался под ареной (обращенное освещение), что улучшало контраст животного с фоном (Kulikov et al., 2008). В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» арена освещалась сверху рассеянным светом, что позволяло автоматически трассировать животное черной масти в открытых рукавах и центре лабиринта. Данные с сенсора передавались на компьютер, где обрабатывались программой EthoStudio, которая вычисляла путь, пройденный животным, и время, проведенное в той или иной части арены (в % от общего времени тестирования). Некоторые параметры фиксировались наблюдателем вручную с помощью нажатий на клавиши (Kulikov et al., 2008).

Тест «открытое поле». Установка для тестирования представляла собой круглую арену диаметром 60 см со стенками высотой 30 см. Животное помещали у стенки арены и давали свободно исследовать пространство в течение 5 мин. Автоматически оценивали общий пройденный путь (см) и время (%) нахождения животного в центральной части арены (30 см в диаметре). Вручную считали количество и среднюю продолжительность вертикальных стоек (с), число дефекаций (Kulikov et al., 2008). После каждого животного арену очищали влажной и сухой салфетками.

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Установка для данного теста представляла собой два пересекающихся по центру под прямым углом рукава длиной 30 см и шириной 6 см, находящихся на высоте 60 см над уровнем земли. Одна пара рукавов имела стенки высотой 20 см (закрытые рукава, безопасные), а другая пара была без стенок (открытые рукава, потенциально опасные). Животное сажали в место пересечения двух

Поведение мышей линий WT и TNFKO в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «принудительное плавание»

Тест	WT	TNFKO	F	p
«открытое поле»				
пройденный путь, м	13,28 ± 0,84	11,92 ± 0,83	$F_{1,22} < 1$	
время в центре, %	15,7 ± 1,48	30,27 ± 3,14	$F_{1,22} = 17,56$	$p < 0,001$
кол-во вертикальных стоек	40,16 ± 7,03	32,75 ± 5,13	$F_{1,22} < 1$	
средняя продолжительность вертикальной стойки, с	0,64 ± 0,04	0,5 ± 0,04	$F_{1,22} = 7,28$	$p < 0,05$
кол-во дефекаций	0,16 ± 0,11	2,33 ± 0,48	$F_{1,22} = 19,16$	$p < 0,001$
«приподнятый крестообразный лабиринт»				
время в рукавах, %				
открытых	11,53 ± 1,59	13,67 ± 3,9	$F_{1,22} < 1$	
закрытых	70,46 ± 2,81	69,55 ± 6,22	$F_{1,22} < 1$	
«принудительное плавание»				
время неподвижности, с	151,56 ± 7,69	154,42 ± 6,42	$F_{1,19} < 1$	

рукавов и автоматически фиксировали перемещение в течение 5 мин. Автоматически оценивали время (%), проведенное в центре, в открытых и закрытых рукавах (Kulikov et al., 2014).

Тест «принудительное плавание». Цилиндр высотой 30 см и диаметром 15 см наполовину заполняли водой ($t = 25^\circ\text{C}$). В воду помещали мышь и в течение 6 мин фиксировали изменение контура животного. Оценивали суммарное время неподвижности животного за последние 4 мин (Kulikov et al., 2010).

Статистика

Результаты представляли как средние ± ошибка среднего и сравнивали с помощью однофакторного ANOVA.

Результаты

В тесте «открытое поле» не было найдено достоверных различий по величине пройденного пути ($F_{1,22} < 1$) и числу вертикальных стоек ($F_{1,22} < 1$) между мышами KO и WT. В то же время мыши KO проводили достоверно больше времени в центре арены по сравнению с мышами WT ($F_{1,22} = 17,56, p < 0,001$), имели меньшую среднюю продолжительность вертикальной стойки ($F_{1,22} = 7,28, p < 0,05$) и увеличенное количество дефекаций ($F_{1,22} = 19,16, p < 0,001$) (таблица).

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» мыши линий KO и WT не имели достоверных различий по времени, проведенному в открытых ($F_{1,22} < 1$), закрытых рукавах ($F_{1,22} < 1$) и в центре ($F_{1,22} < 1$) (таблица).

В тесте «принудительное плавание» не было обнаружено различий по времени неподвижности между мышами линий KO и WT ($F_{1,19} < 1$) (таблица).

Обсуждение

В данной работе мы изучали влияние нокаута гена ФНО на двигательную активность, исследовательское поведение, тревожность и депрессивно-подобное поведение у линии мышей, полученных группой С.А. Недоспасова

(Kuprash et al., 2005). Для этого были использованы тесты «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «принудительное плавание», которые являются обязательными для поведенческого фенотипирования мутантных и трансгенных мышей (Crawley, 2008).

В тесте «открытое поле» в условиях мягкого стресса (открытое освещенное пространство, новая обстановка) изучали влияние нокаута по ФНО на двигательную активность (пройденный путь), исследовательское поведение (число и длительность вертикальных стоек) и тревожность (время в центре, количество дефекаций) (Denenberg, 1969; Prut, Belzung, 2003; Tecott, 2003; Standford, 2007). Нокаут по ФНО не влияет на двигательную активность мышей, что также было показано на другой нокаутной линии (Camara et al., 2013). Противоречивые результаты были получены относительно влияния нокаутирования по ФНО на исследовательскую активность и тревожность. Открытые освещенные пространства для мышей являются потенциально опасными. Попадая в такие условия, мыши с высоким уровнем тревожности будут больше времени проводить у стенок арены, меньше исследовать арену, а мыши с низким уровнем тревожности будут наоборот больше времени проводить в центре и активной исследовать пространство. По сравнению с мышами дикого типа, мыши нокаутной линии достоверно больше времени проводят в центре арены, что соответствует более низкому уровню тревожности, но при этом средняя продолжительность вертикальных стоек у них меньше, что свидетельствует о сниженном исследовательском поведении. К тому же у TNFKO увеличено количество дефекаций, что указывает на стрессовое состояние животных.

Чтобы проверить результаты по тревожности, мы использовали тест «приподнятый крестообразный лабиринт». В этом тесте мыши избегают появляться в открытых рукавах из-за высокого риска падения и предпочитают находиться в защищенных закрытых рукавах (Pellow et al., 1985; Belzung, Griebel, 2001; Wahlstein et al., 2003; Milner,

Scabbe, 2008). Мы не обнаружили эффекта дефицита ФНО на время, проведенное в открытых, закрытых рукавах и в центре крестообразного лабиринта.

Интерпретируя результаты, полученные в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» и «открытое поле», мы пришли к выводу, что состояние мышей с дефицитом ФНО не является тревожным, а скорее дезориентированным. К такому же выводу в своей работе приходят Golan с соавт. (Golan et al., 2004), но в отличие от наших результатов они показали, что мыши с нокаутом по ФНО (Pasparakis et al., 1996) предпочитали находиться на периферии в тесте «открытое поле». Вероятно, данное различие связано с тем, что время тестирования в открытом поле у них составляло 2 мин. Но в других работах исследователи показывают, что нокаут по ФНО влияет на тревожность, правда, результаты получаются противоречивые. Так, Samaга с соавт. (Samaга et al., 2013) обнаружили, что нокаутные мыши больше времени проводили в открытых рукавах О-образного лабиринта, что говорит о сниженном уровне тревожности, в то время как в работе Yamada с соавт. (Yamada et al., 2000) показано, что мыши с дефицитом ФНО проводят меньше времени в открытых рукавах, что соответствует повышенной тревожности.

В тесте «принудительное плавание» время неподвижности положительно коррелирует с депрессивно-подобным поведением. Большинство клинически эффективных антидепрессантов снижают время неподвижности в данном тесте (Porsolt et al., 1977; Willner, 1990; Willner, Mitchell, 2002; Cryan, Mombereau, 2004). Как и в работе Samaга с соавт. (2013), мы не обнаружили различий по времени неподвижности между нокаутными животными и диким типом, в то время как в работе, выполненной другой группой ученых (Yamada et al., 2000), мыши с дефицитом ФНО меньше замирали в тесте принудительного плавания.

На результаты поведенческих тестов могли оказать влияние: 1) условия содержания животных (в свободной от патогенов среде или нет); 2) время суток, в которое проводилось тестирование; 3) возраст животных; 4) различия в методиках тестирования.

Существует целый ряд цитокинов, которые могут влиять на поведение животных в тестах. При активации иммунной системы происходит выброс в кровь ряда цитокинов, которые, проходя через гематоэнцефалический барьер или передавая через него сигнал, влияют на клетки центральной нервной системы и на поведение. Чтобы минимизировать влияние цитокинов, мы проводили тестирование в свободных от патогенов условиях. Samaга с соавт. (2013) в своей работе кроме того провели анализ крови на наличие цитокинов, чтобы показать, что тестирование проводилось в условиях отсутствия воспалительных процессов. В других работах статус животных не указан.

Известно, что уровень некоторых гормонов меняется в течение суток. Samaга с соавт. (2013) тестировали своих животных в светлое время суток, когда у мышей отмечается стадия покоя и сна. Поведение тестирования в неурочное время могло повлиять на поведение животных. К сожалению, в других статьях не указано время проведения тестов.

Кроме того, важным фактором, который влияет на поведение нокаутных животных, является возраст. В своей статье Yamada не указывает возраст мышей, между тем есть данные, что с возрастом поведение животных с нокаутом по ФНО меняется чуть ли не на противоположное (McAfoose et al., 2009).

Таким образом, нокаут по ФНО не влияет на двигательную активность и депрессивно-подобное поведение. Однако у него есть определенное влияние на состояние тревожности животного, что требует более детального исследования в других парадигмах.

В данной работе в стандартной батарее тестов была впервые протестирована линия с нокаутом по ФНО, созданная группой С.А. Недоспасова. Нокаут гена ФНО достоверно увеличивал время, проведенное в центре открытого поля, но не влиял на двигательную активность, тревожность в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» и депрессивно-подобное поведение в тесте «принудительное плавание». Полученные данные позволяют предположить, что отсутствие данного цитокина влечет за собой изменения в нейрофункциональных взаимодействиях, что приводит к изменению ответа на легкий стресс в тесте «открытое поле» у мышей.

Благодарности

Работа была выполнена в рамках бюджетного проекта VI.53.2.1. при финансовой поддержке гранта РФФИ 15-04-08254.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Belzung C., Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice: a review. *Behav. Brain Res.* 2001;125:141-149.
- Bradley J.R. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 2008; 214(2):149-160. DOI: 10.1002/path.2287
- Camara M.L., Corrigan F., Jaehne E.J., Jawahar M.C., Anscob H., Koerner H., Baune B.T. TNF- α and its receptors modulate complex behaviours and neurotrophins in transgenic mice. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(12):3102-3114. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2013.09.010
- Crawley J.N. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron.* 2008;57:809-818.
- Cryan J.F., Mombereau C. In search of a depressive mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol. Psychiatry.* 2004;9:326-357.
- Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav. Immun.* 2001;15(1):7-24.
- Denenberg V.H. Open-field behavior in the rat: What does it mean? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1969;159:852-859.
- Drutskaya M.S., Ortiz M., Liepinsh D.J., Kuprash D.V., Nedospasov S.A., Keller J.R. Inhibitory effects of tumor necrosis factor on hematopoiesis seen in vitro are translated to increased numbers of both committed and multipotent progenitors in TNF-deficient mice. *Exp. Hematol.* 2005;33(11):1348-1356.
- Golan H., Levav T., Mendelsohn A., Huleihel M. Involvement of tumor necrosis factor alpha in hippocampal development and function. *Cereb. Cortex.* 2004;14(1):97-105.
- Kaster M.P., Gadotti V.M., Calixto J.B., Santos A.R., Rodrigues A.L. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α in mice. *Neuropharmacology.* 2012;62(1):419-426. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.018

- Körner H., Cook M., Riminton D.S., Lemckert F.A., Hoek R.M., Ledermann B., Kontgen F., Fazekas de St. Groth B., Sedgwick J.D. Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue. *Eur. J. Immunol.* 1997;27(10):2600-2609.
- Kulikov A.V., Morozova M.V., Kulikov V.A., Kirichuk V.S., Popova N.K. Automated analysis of antidepressants' effect on the forced swim test. *J. Neurosci. Meth.* 2010;191:26-31.
- Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikov V.A. Automated measurement of special preference in the open field test with transmitted lighting. *J. Neurosci. Meth.* 2008;170:345-351.
- Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikova E.A., Volcho K.P., Khomenko T.M., Salakhutdinov N.F., Popova N.K. Antidepressant activity of 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153): Comparison with classical antidepressants. *Lett. Drug Design Discov.* 2014;11:169-173.
- Kuprash D.V., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Koroleva E.P., Druts-kaya M.S., Kruglov A.A., Shakhov A.N., Southon E., Murphy W.J., Tessarollo L., Grivennikov S.I., Nedospasov S.A. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches. *Eur. J. Immunol.* 2005;35(5):1592-1600.
- Li J., Ramenaden E.R., Peng J., Koito H., Volpe J.J., Rosenberg P.A. Tumor necrosis factor alpha mediates lipopolysaccharide-induced microglial toxicity to developing oligodendrocytes when astrocytes are present. *J. Neurosci.* 2008;28(20):5321-5330. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3995-07.2008
- Marino M.W., Dunn A., Grahl D., Inglese M., Noguchi Y., Richards E., Jungbluth A., Wada H., Moore M., Williamson B., Basu S., Old L.J. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1997;94(15):8093-8098.
- McAfoose J., Koerner H., Baune B.T. The effects of TNF deficiency on age-related cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34(4):615-619. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2008.10.006
- McCoy M.K., Tansey M.G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J. Neuroinflammation.* 2008;5(45). DOI: 10.1186/1742-2094-5-45
- Milner L.C., Crabbe J.C. Three murine anxiety models: results from multiple inbred strain comparison. *Genes Brain Behav.* 2008;7:496-505.
- Montgomery S.L., Bowers W.J. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2012;7(1):42-59. DOI: 10.1007/s11481-011-9287-2
- Pasparakis M., Alexopoulou L., Episkopou V., Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J. Exp. Med.* 1996;184(4):1397-1411.
- Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 1985;14:149-167.
- Porsolt R.D., Le Pichon M., Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977;266:730-732.
- Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 2003;463:3-33.
- Schioppa T., Moore R., Thompson R.G., Rosser E.C., Kulbe H., Nedospasov S., Mauri C., Coussens L.M., Balkwill F.R. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011;108(26):10662-10667. DOI: 10.1073/pnas.1100994108
- Standford C. The open field test: reinventing the wheel. *J. Psychopharmacol.* 2007;21:134-135.
- Tecott L.H. The genes and brain of mice and men. *Am. J. Psychiatry.* 2003;160:646-656.
- Wahlsten D., Rustay N.R., Metten P., Crabbe J.C. In search of a better mouse test. *Trends Neurosci.* 2003;26:132-136.
- Willner P. Animal models of depression: an overview. *Pharmacol. Ther.* 1990;45:425-455.
- Willner P., Mitchell P.J. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav. Pharmacol.* 2002;13:169-188.
- Yamada K., Iida R., Miyamoto Y., Saito K., Sekikawa K., Seishima M., Nabeshima T. Neurobehavioral alterations in mice with a targeted deletion of the tumor necrosis factor-alpha gene: implications for emotional behavior. *J. Neuroimmunol.* 2000;111(1/2):131-8.