

ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У МЫШЕЙ-РЕЦИПИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МОДУЛИРОВАННЫХ ИММУННЫХ КЛЕТОК

© 2019 г. Е. В. Серенко*, М. А. Княжева

*E-mail: serenko.evgeniy@mail.ru

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
Новосибирск, Россия

Поступила: 18.05.2019. Принята: 24.06.2019

В данной статье рассматривается проблема регуляторных взаимоотношений основных адаптационных систем организма – иммунной и нервной. Все больше данных свидетельствуют о том, что иммунная система способна оказывать координирующее влияние на поведение и эмоциональные реакции животных и человека. Ориентировочно-исследовательское поведение представляет собой один из важнейших типов поведения, который обеспечивает индивидуума знанием об окружающей среде и является существенным психологическим механизмом адаптации высших позвоночных. Целью статьи является анализ психофизиологических показателей у экспериментальных животных после трансплантации иммунных клеток, функциональная активность которых была экстракорпорально изменена психоактивным веществом. Продемонстрировано, что после трансплантации иммунных клеток с модулированной *in vitro* аминазином функциональной активностью у мышей-реципиентов регистрируются редактирование указанного поведения на фоне повышения в головном мозге цитокинов ИЛ-1β, ФНОα, ИЛ-6; а также снижение интенсивности гуморального и клеточного иммунного ответа. Представленные результаты показывают возможность использования иммунных клеток в качестве модельных объектов для воздействия на нейроиммунную функциональную взаимосвязь; равно как и перспективность применения клеточных технологий для редактирования поведенческих паттернов.

Ключевые слова: иммунные клетки, аминазин, иммунный ответ, мозг, цитокины, поведение

DOI: 10.31857/S102872210007267-8

Адрес: 630099, Новосибирск, Ядринцевская ул., 14, ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», лаборатория нейроиммунологии, Серенко Евгений Владимирович. Тел./ факс: +7(383) 222-06-72, +79039346786 (моб.).

E-mail: serenko.evgeniy@mail.ru

Авторы:

Серенко Е. В., аспирант лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Княжева М. А., аспирант лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире в последние десятилетия проявляют себя последствия стресса, вызванного стихийными бедствиями, военными конфликтами, техногенными катастрофами, которые могут приводить к нарушению механизмов адаптации и, как следствие, формированию нарушений

в психоэмоциональной сфере, существенным звеном патогенеза которых является нарушение нейроиммунных взаимодействий [1, 2, 3, 4, 5]. Психоактивные препараты, применяемые для коррекции поведенческих расстройств достаточно эффективны, однако, обладают рядом негативных побочных эффектов, что в ряде случаев ограничивает возможности их длительного использования. Кроме того растет количество пациентов, резистентных к данной терапии [6]. Одним из способов решения этой проблемы является разработка новых методов терапии поведенческих расстройств на основе иммунологических подходов.

Ориентировочно-исследовательское поведение (ОИП) представляет собой один из важнейших типов поведения, который обеспечивает индивидуума знанием об окружающей среде и является существенным психологическим ме-

ханизмом адаптации высших позвоночных. Активное поведение в условиях неопределенности – значимый фактор соматического здоровья, предотвращающий возникновение психосоматических заболеваний и повышающий устойчивость организма к стрессу [7]. Установлено, что функциональная активность иммунной системы и, в частности, ее клеточных элементов, связана с уровнем ОИП, параметры которого могут быть направленно изменены трансплантацией иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками [3, 8, 9, 10, 11].

Цель исследования: оценить психофизиологические показатели у экспериментальных животных после трансплантации иммунных клеток, функциональная активность которых была экстракорпорально изменена обработкой аминазином.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании в качестве доноров и реципиентов использовались мыши-самцы (СВАхС57В1/6) F1 в возрасте трех месяцев; средний вес животных составлял 20–25 граммов. Животных содержали в условиях лабораторного вивария по 10 особей в клетке, не менее 2-х недель до начала экспериментов на стандартной диете, при свободном доступе к воде и нормальном световом режиме. Эксперимент проводился соответственно правилам, принятым на Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986 г.), правилам лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003, № 267).

ОИП животных (интактных и после клеточной трансплантации) оценивали в тесте «открытое поле» [12]. По характеру поведения в «открытом поле» мыши (СВАхС57В1/6) F1 делятся на три группы: с высоким, средним и низким уровнями указанного поведения [3, 13]. Учитывая фармакологический эффект аминазина, в экспериментах в качестве доноров и реципиентов использовались животные характеризующиеся высоким уровнем ОИП, т.е. активным типом указанного поведения.

Спленциты мышей-доноров выделяли в стерильных условиях, обрабатывали *in vitro* аминазином, из расчета 15×10^6 клеток / 150 мкг препарата в течение 25 минут, и трансплантировали реципиентам согласно описанной ранее методи-

ке [14]. Концентрация нейрорептика, применяемая для обработки клеток, определялась путем перерасчета терапевтической дозы, с учетом веса и особенностей метаболизма животных. Жизнеспособность клеток определяли окраской трипановым синим. Контрольным животным трансплантировали клетки в аналогических условиях эксперимента, за исключением того, что иммунциты прекультивировались без аминазина. У мышей-реципиентов определялись параметры ОИП, количественное содержание цитокинов в лизатах клеток головного мозга, гуморальный и клеточный иммунный ответ.

Лизаты головного мозга животных получали путем гомогенизирования тканей в среде RPMI-1640 с добавлением 0,1% Triton X–100 (GERBU Biotechnik GmbH), с центрифугированием 10000 об/мин в течение 3 минут. Надосадочную жидкость содержали при -80 °С до момента исследования.

Исследование пролиферативной активности клеток после обработки *in vitro* аминазином оценивали стандартным методом по включению в нуклеопротеидные фракции клеток радиоактивной метки (^3H -тимидин). Результаты представляли в виде среднего счета в имп/мин.

Количественное содержание цитокинов оценивали методом ИФА (ELISA) с использованием компонентов к цитокинам мыши производства фирмы “R&D Systems” (Великобритания), согласно инструкции фирмы производителя. Чувствительность наборов для ИЛ-1 β не превышает 5 пг/мл, для ИЛ-6 – 2 пг/мл, для ФНО α – 1 пг/мл.

Интенсивность гуморального иммунного ответа оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК) в селезенке на 5-е сутки после внутрибрюшинной иммунизации антигеном модифицированным методом А. J. Cunningham [15].

Интенсивность клеточного иммунного ответа оценивали по высоте реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Для этого мышей иммунизировали внутрибрюшинным введением эритроцитов барана (0,5% – 0,5 мл.). Разрешающую дозу указанного антигена (50% – 0,05 мл.) вводили под апоневроз задней стопы через 96 часов. Формирование реакции ГЗТ оценивали через 24 часа после разрешающей инъекции по степени опухания лапы (изменения её толщины по сравнению с позитивно-контрольной задней лапой того же животного, в которую была введена среда RPMI-1640). Индекс

реакции (ИР) определяли для каждой мыши по формуле $ИР = (P_0 - P_k) / P_k$ и выражали в процентах [16].

Статистическая обработка результатов производилась с применением парного критерия Манна-Уитни, используя компьютерную программу "Statistica 10.0". Результаты представлены в виде $M \pm SD$. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного исследования показано, что культивирование с аминазином спленоцитов мышей модулирует функциональную активность иммунных клеток, проявляющуюся в снижении спонтанной пролиферативной активности (Рис. 1).

Трансплантация спленоцитов с модулированной *in vitro* аминазином функциональной активностью сингенным мышам с активным типом ОИП сопровождалась у реципиентов редактированием указанного поведения, что выражалось в снижении показателей горизонтальной двигательной активности, отражающей моторный компонент ОИП, равно как и показателей вертикальной двигательной активности, отражающей исследовательский компонент поведения (Табл. 1).



Рис. 1. Спонтанная пролиферативная активность спленоцитов (имп/мин) мышей (CBAx57Bl)F1, обработанных *in vitro* аминазином ($M \pm SD$)

Примечание: 1 – спленоциты культивированные без аминазина; 2 – спленоциты, культивированные с аминазином; * – $p < 0,01$ между контрольной и опытной группами животных.

Указанные изменения в поведении мышей-реципиентов после трансплантации модулированных аминазином иммунных клеток регистрировались на фоне достоверного повышения количественного содержания в головном мозге ряда провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α (Табл. 2).

Известно, что указанные цитокины задействованы в реализации поведенческих реакций

Таблица 1. Параметры ориентировочно-исследовательского поведения мышей-реципиентов (CBAx57Bl)F1 после трансплантации спленоцитов, обработанных *in vitro* аминазином ($M \pm SD$)

Группы животных-реципиентов	Горизонтальная двигательная активность			Вертикальная двигательная активность		
	периферическая	центральная	суммарная	свободные стойки	стойки с опорой на стенку	суммарная
контроль (n = 47)	144,0 \pm 13,9	8,0 \pm 4,0	152,0 \pm 17,9	0,8 \pm 0,2	2,2 \pm 1,1	2,9 \pm 1,3
опыт (n = 38)	70,7 \pm 9,9*	0,4 \pm 0,1*	71,1 \pm 10,1*	0,2 \pm 0,5*	0,7 \pm 0,1*	1,0 \pm 0,6*

Примечание: Опытная группа – мыши-реципиенты после трансплантации спленоцитов, экстракорпорально обработанных аминазином. Контрольная группа – мыши-реципиенты после трансплантации спленоцитов, прекультивированных без аминазина. * – $p < 0,01$ между контрольной и опытной группами животных

Таблица 2. Содержание цитокинов в лизатах головного мозга мышей-реципиентов (CBAx57Bl)F1 после трансплантации спленоцитов, обработанных *in vitro* аминазином ($M \pm SD$)

Группы животных -реципиентов	Содержание цитокинов (пг/мл)		
	ИЛ-1 β	ИЛ-6	ФНО α
Контрольная группа (n = 12)	82,7 \pm 37,0	688,5 \pm 101,8	152,5 \pm 25,3
Опытная группа (n = 12)	135,4 \pm 22,3*	976,7 \pm 117,6*	202,9 \pm 46,7*

Примечание: опытная группа – мыши-реципиенты после трансплантации спленоцитов экстракорпорально обработанных аминазином; контрольная группа – мыши-реципиенты после трансплантации спленоцитов прекультивированных без аминазина. * – $p < 0,01$ между контрольной и опытной группами животных.

Таблица 3. Гуморальный и клеточный иммунный ответ у мышей-реципиентов (СВАхС57Вl)F1 после трансплантации спленоцитов, обработанных *in vitro* аминазином (M ± SD)

Исследуемый параметр	Группы животных (n=10 в каждой группе)	
	Контроль	Опыт
Число АОК/10 ⁶ ядросодержащих клеток селезенки	463,6±190,6	188,2±111,5**
Число АОК на селезенку	112764,5±24138	58643,7±9275,5**
Реакция ГЗТ (ИР %)	51,9±23,4	28,8±12,6*

Примечание: опытная группа – мыши-реципиенты после трансплантации спленоцитов экстракорпорально обработанных аминазином; контрольная группа – мыши-реципиенты после трансплантации спленоцитов, прекультивированных без аминазина. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ между соответствующими показателями в контрольной и опытной группах животных.

высших позвоночных, равно как и играют существенную роль в патогенезе поведенческих расстройств [1, 2, 4, 6, 9]. Изменение содержания этих регуляторных цитокинов в центральной нервной системе реципиентов может быть одним из механизмов показанного выше редактирования их поведения модулированными психоактивным веществом иммунными клетками.

Показана также модуляция иммунного ответа у сингенных мышей-реципиентов после трансплантации спленоцитов, обработанных *in vitro* аминазином. Это выражается в снижении относительного и абсолютного количества АОК селезенки, что отражает интенсивность гуморального звена иммунного ответа, а также в снижении высоты реакции ГЗТ, отражающей интенсивность клеточного звена иммунного ответа (Табл. 3).

Таким образом, трансплантация иммунных клеток с модулированной экстракорпорально аминазином функциональной активностью сопровождается:

а) изменением функциональной активности нервной системы реципиентов, о чем свидетельствует снижение параметров ОИП на фоне повышения в головном мозге уровней цитокинов ИЛ-1 β , ФНО α , ИЛ-6;

б) модуляцией функциональной активности иммунной системы реципиентов, о чем свидетельствует снижение интенсивности гуморального и клеточного иммунного ответа.

Представленные результаты показывают возможность использования иммунных клеток в качестве модельных объектов для воздействия на нейроиммунную функциональную взаимосвязь; равно как и перспективность применения клеточных технологий для редактирования поведенческих паттернов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ader R. Psychoneuroimmunology. University of Chicago Press. 2007. V.1. 1269 p.
2. Straub R. H., Cutolo M. Psychoneuroimmunology-developments in stress research. //Wien Med. Wochenschr. 2018. – V. 168 (3–4). – P. 76–84.
3. Маркова Е. В. Иммунная система и высшая нервная деятельность. Механизмы нейроиммунных взаимодействий в реализации и регуляции поведенческих реакций / Saarbrücken, 2012. [Markova E. V. Immune system and higher nervous activity. Mechanisms of neuroimmune interactions in realization and regulation of behavioural reactions / Saarbrücken, 2012.]
4. Идова Г. В., Маркова Е. В., Геворгян М. М., Альперина Е. Л., Жукова Е. Н. Изменения продукции цитокинов клетками селезенки мышей линии C57BL/6J при агрессии, индуцированной социальным стрессом// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.–2015.– Т. 160.– № 11.– С. 631–634. [Idova G. V., Markova E. V., Gevorgyan M. M., Alperina E. L., Zhukova E. N. Changes of products of tsitokin cells of a spleen of mice of the C57BL/6J line at the aggression induced by a social stress//the Bulletin of experimental biology and medicine.–2015.– V 160.–№ 11.– P.–631–634.]
5. Никитина В. Б., Ветлугина Т. П., Лобачева О. А., Невидимова Т. И., Стоянова И. Я. Система иммунитета и психологическая защита в механизмах психоэмоционального стресса // Международный журнал экспериментального образования. 2017. № 5. С. 116–117. [Nikitina V. B., Vetlugina T. P., Lobacheva O. A., Nevidimova T. I., Stoyanova I. Ya. The system of immunity and psychological protection in mechanisms of a psychoemotional stress//the International magazine of experimental education. 2017.–№ 5. P.– 116–117.]
6. Ветлугина Т. П., Никитина В. Б., Лобачева О. А., Невидимова Т. И. Основы клинической психонейроиммунологии. Учебно-методическое пособие / Томск, 2014. [Vetlugina T. P., Nikitina V. B., Lobacheva O. A., Nevidimova T. I. Fundamentals of clinical

- psychoneuroimmunology. Educational and methodical grant. — Tomsk, 2014.]
7. *Rotenberg V.S.* Search activity concept: relationship between behavior, health and brain functions. *Activitas Nervosa Superior*. 2009; 51 (1): 12–44.
 8. *Маркова Е. В., Абрамов В. В., Козлов В. А.* Имунокомпетентные клетки и регуляция поведения у животных // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. — 2007. Т. 27. — № 2. — С. 6–9. [*Markova E. V., Abramov V. V., Kozlov V. A.* Immunocompetent cages and regulation of behavior at animals // the Bulletin of the Siberian office of the Russian Academy of Medical Science. — 2007. Т. 27. — № 2. — Р. — 6–9.]
 9. *Маркова Е. В., Княжева М. А., Козлов В. А.* Клеточные механизмы нейроиммунных взаимодействий в регуляции ориентировочно-исследовательского поведения // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. — 2013. — № 1 (76). — С. 49–52. [*Markova E. V., Knyazheva M. A., Kozlov V. A.* Kletochnyye mechanisms of neuroimmune interactions in regulation of approximate and research behavior // the Siberian messenger of psychiatry and narcology. — 2013. — № 1 (76). — Р. — 49–52.]
 10. *Маркова Е. В., Абрамов В. В., Короткова Н. А., Козлов В. А.* Влияние трансплантации иммунокомпетентных клеток на ориентировочно-исследовательское поведение и экспрессию генов цитокинов в головном мозге животных // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2006. — Т. 142. — № 9. — С. 309–312. [*Markova E. V., Abramov V. V., Korotkova N. A., Kozlov V. A.* Influence of transplantation of immunocompetent cages on approximate and research behavior and an expression of genes of tsitokin in a brain of animals // Bulletin of experimental biology and medicine. — 2006. — Т. 142. — № 9. — Р. — 309–312.]
 11. *Маркова Е. В., Короткова Н. А., Абрамов В. В., Козлов В. А.* Регуляция поведенческих реакций у мышей путем трансплантации иммунокомпетентных клеток // Российский иммунологический журнал. — 2004. — Т. 9. — № S1. — С. 90. [*Markova E. V., Korotkova N. A., Abramov V. V., Kozlov V. A.* Regulation of behavioural reactions at mice by transplantation of immunocompetent cages // Russian journal of immunology. — 2004. — Т. 9. — № 9. — Р. — 90.]
 12. *Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П.* // Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М., 1991: 399. [*Buresh Ya., Bureshova O., Houston J. P.* “Methods and Basic experiments in Studies of the Brain and Behavior.” Vysshaya Shkola, Moscow (1991): 119–122.]
 13. *Маркова Е. В., Княжева М. А., Рюмина Т. В., Козлов В. А.* Особенности функционирования клеток иммунной системы у особей с агрессивно- и депрессивноподобными типами поведения // В мире научных открытий. — 2014. — № 8 (56). — С. 131–147. [*Markova E. V., Knyazheva M. A., Ryumina T. V., Kozlov V. A.* Features of functioning of cages of the immune system at individuals with aggressive and depressivnopodobny types of behavior // In the world of discoveries. — 2014. — № 8 (56). — Р. — 131–147.]
 14. *Маркова Е., Княжева М., Шущпанова Т.* Neuroleptic effect in aggressive mice after the transplantation of immune cells treated in vitro with chlorpromazine // *European Psychiatry*. — 2016. — Т. 33. — № S. — С. 263.
 15. *Cunningham A. J.* A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature*. 1965 Sep 4; 207(5001):1106–1107
 16. *Yoshikai Y., Miake S., Matsumoto T., et al.* Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed footpad reaction to SRBC in mice. // *Immunol.* — 1979. — V. 38. — N.3. — P. 577–583.

PSYCHOPHYSIOLOGICAL INDICATORS IN MICE RECIPIENTS AFTER MODULATED IMMUNE CELLS TRANSPLANTATION

© 2019 E. V. Serenko*, M. A. Knyazheva

*E-mail: serenko.evgeniy@mail.ru

Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental
and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

Received: 18.05.2019. Accepted: 24.06.2019

This article deals with the problem of the regulatory relationships of the main adaptive systems of the body, immune and nervous. Increasing evidence suggests that the immune system is able to have a coordinating influence on the behavior and emotional responses of animals and humans. Exploratory behavior is one of the most important types of behavior, which provides the individual with knowledge of the environment and is an essential psychological mechanism of adaptation of higher vertebrates. The purpose of the article was to analyze the psychophysiological indicators in experimental animals after transplantation of immune cells, the functional activity of which was in vitro modulated by the treatment with a psychoactive substance. It was demonstrated that in recipient mice after transplantation of modulated with aminazine immune cells exploratory behavioral editing is recorded against the background of cytokines IL-1 β , TNF α , IL-6 increase in the brain; as well as a decrease in the intensity of the immune response. The presented results show the possibility of using immune cells as model objects for influencing the neuroimmune functional relationship; as well as the promising application of cellular technologies for behavioral patterns editing.

Key words: immune cells, aminazine, immune response, brain, cytokines, behavior

Authors:

Serenko E. V., ✉ postgraduate student, Laboratory of neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

Novosibirsk, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Laboratory of Neuroimmunology. Phone: +7(383) 222-06-72, +79039346786, **E-mail:** serenko.evgeniy@mail.ru;

Knyazheva M. A., postgraduate student, Laboratory of neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia.