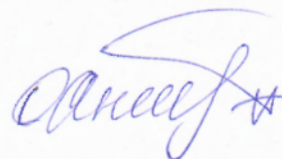


На правах рукописи



Аникеева Ольга Сергеевна

**НЕЙРОИММУНОЭНДОКРИННЫЙ СТАТУС У ВЗРОСЛЫХ
РЕЦИПИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В ЮВЕНИЛЬНОМ ПЕРИОДЕ:
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в экспериментальном отделе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук **Маркова Евгения Валерьевна**

Официальные оппоненты:

Ветлугина Тамара Парфеновна, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН

Шурлыгина Анна Вениаминовна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник НИИ клинической и экспериментальной лимфологии– филиала ИЦИГ СО РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук

Защита состоится «__» _____ 2020 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д001.001.01 в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» и на сайте <https://niikim.ru/ru/наука/объявления-диссовета>.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Облеухова Ирина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

С позиций современной науки изучение различных аспектов функционирования основных адаптационных систем организма иммунной и нейроэндокринной является одной из актуальных проблем экспериментальной медицины и биологии, что обусловлено важнейшей ролью указанных систем, функционирующих в постоянном взаимодействии, в поддержании гомеостаза на всех этапах онтогенеза. Указанные регуляторные системы имеют общее гуморальное поле – цитокины, нейромедиаторы, нейропептиды, простагландины и др., обеспечивающее реализацию и собственных функций, и межсистемное взаимодействие, используя при этом также свои клеточные элементы, которые имеют выраженное функциональное и фенотипическое сходство [Ader, 2007; Yirmiya, 2011; Kipnis, 2012; Bilbo, 2012; Herkenham, 2017; Filiano, 2017; Dantzer, 2018]. Изучение морфофункциональных основ общих регуляторных реакций, механизмов формирования связей между различными структурами, по сути, единой нейроиммуноэндокринной системы с целью поддержания динамического гомеостаза, относится к одной из фундаментальных задач современной медико-биологической науки и представляется весьма перспективным в исследовании физиологических основ жизнедеятельности и патогенетических механизмов различных форм дисрегуляторной патологии.

Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что на развитие и дальнейшее функционирование основных адаптационных систем организма влияют не только генетические факторы, но и окружающая среда (стресс, травматическое воздействие, экология и несбалансированное питание, инфекционные агенты, фармакологическое воздействие и др.). Одним из таких факторов может быть терапевтическое воздействие, в том числе и клеточные технологии, которые активно развиваются и применяются в последнее время, в том числе и в детском возрасте. Пластичность основных гомеостатических систем позволяет организму сопротивляться действиям неблагоприятных факторов, но, тем не менее, последние могут вызывать патологические изменения или приводить к ограничению функции данных систем [Cameron, 2008; Schwartz, 2013; Nusslock, 2016; Захарова, 2017]. Наиболее подвержен неблагоприятным факторам организм в критические периоды своего развития, такие как эмбриональный, младенчество, детство, пубертатный возраст [Shulz, 2016; Stavrou, 2017]. К началу постнатального периода иммунная и нейроэндокринная системы ещё до конца не сформированы, хотя их функциональное взаимодействие начинается уже в период пренатального онтогенеза [Provinciali, 1991; Izvolskaia, 2016], продолжая формироваться на ранних этапах постнатального развития организма [Bilbo, 2012; Clark, 2018] вплоть до достижения половозрелого возраста; что обуславливает принципиальную возможность влияния на этот процесс, равно как и на формирование нейроиммуноэндокринного фенотипа индивидуумов, действующих на организм в эти периоды различных факторов среды, включая терапевтические воздействия.

Достижения современной медицины обеспечили развитие клеточных технологий и их успешное использование в терапии многих нозологических форм иммунологических, онкологических и гематологических заболеваний, что позволило значительно повысить выживаемость и качество жизни пациентов, а также увеличить число выполняемых процедур за счет расширения возрастных рамок и возможности проведения данного лечения у больных с тяжелыми соматическими заболеваниями [Burroughs, 2012; Мачнева, 2019]. При этом остаются недостаточно изученными механизмы воздействия трансплантируемых клеток на организм в целом, особенно в детском возрасте, когда идет формирование регуляторных связей основных гомеостатических систем организма, и сложно прогнозировать отдаленный эффект терапии, поскольку, даже при направленном воздействии на одну из них, влияние оказывается на взаимосвязанное функционирование всех указанных систем.

Рядом авторов показано, что иммунокомпетентные клетки (ИКК) животных с оппозиционными типами ориентировочно-исследовательского поведения (ОИП) различаются по своим функциональным свойствам [Markova, 1999-2009; Маркова, 2000 -2014; Viveros, 2001; Poveshchenko, 2002; Brachman, 2015], более того, установлена возможность и определены основные механизмы направленного изменения паттернов поведения у половозрелых реципиентов путем трансплантации ИКК с определенными функциональными характеристиками [Markova, 2002- 2016; Маркова, 2006 -2013]. Способность лимфоцитов после адоптивного переноса модулировать поведение и когнитивные функции, в том числе и путем непосредственного контакта с клетками ЦНС, показана также и другими исследователями [Rattazzi, 2013; Radjavi, 2014; Song, 2016; Clark, 2016, 2018].

Вышеизложенное ставит вопрос о возможности влияния ИКК на формирование нейроиммуноэндокринного фенотипа, включая поведенческий паттерн реципиентов, при трансплантации клеток, проведенной в ранние периоды постнатального онтогенеза, когда ещё не завершён процесс формирования межсистемных регуляторных связей. Высокая функциональная пластичность, чувствительность ко многим регуляторным факторам иммунной, нервной и эндокринной систем и формирование специфических взаимодействий обеспечивает возможность влияния на процессы их развития и взаиморегуляции. Исследования в этой области позволяют расширить представления о механизмах взаимодействия основных гомеостатических систем организма и понимание причин патологических состояний, связанных с нарушением нейроэндокрино-иммунных регуляторных связей, равно как и обосновать новые подходы к их оптимальной терапии.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось изучение влияния трансплантированных в ювенильном периоде иммунокомпетентных клеток от сингенных доноров с активным и пассивным типом поведения на формирование иммунного и нейроэндокринного фенотипов у половозрелых реципиентов.

Задачи:

1. Охарактеризовать фенотипические и функциональные свойства иммунокомпетентных клеток в популяции спленоцитов у животных с активным и пассивным типом поведения.
2. Исследовать показатели иммунитета (гуморальный и клеточный иммунный ответ *in vivo*; пролиферативная активность спленоцитов, уровень апоптоза и продукция цитокинов *in vitro*) у половозрелых реципиентов после повторной трансплантации в ювенильном периоде спленоцитов от сингенных доноров с активным типом поведения в сравнении с контрольной группой животных без адоптивного переноса клеток.
3. Оценить показатели иммунитета половозрелых реципиентов после повторной трансплантации в ювенильном периоде спленоцитов от сингенных доноров с пассивным типом поведения в сравнении с контрольной группой животных без адоптивного переноса клеток.
4. Изучить показатели нейроэндокринного статуса (параметры ориентировочно-исследовательского поведения, интрацеребральный уровень цитокинов и нейротрофического фактора головного мозга, концентрации кортикостерона и тестостерона в сыворотке крови и в головном мозге) у половозрелых реципиентов после повторной трансплантации в ювенильном периоде спленоцитов от сингенных доноров с активным типом поведения в сравнении с контрольной группой животных без адоптивного переноса клеток.
5. Исследовать показатели нейроэндокринного статуса половозрелых реципиентов после повторной трансплантации в ювенильном периоде спленоцитов от сингенных доноров с пассивным типом поведения в сравнении с контрольной группой животных без адоптивного переноса клеток.
6. На основе полученных экспериментальных данных установить общие закономерности влияния повторной трансплантации в ювенильном периоде иммунокомпетентных клеток доноров с различными (активным и пассивным) типами поведения на формирование у

сингенных реципиентов к половозрелому возрасту иммунного и нейроэндокринного фенотипов.

Научная новизна

Впервые охарактеризованы основные показатели и выявлены отличительные признаки нейроиммуноэндокринного статуса половозрелых реципиентов после проведенной в ювенильном периоде повторной трансплантации ИКК с различными функциональными характеристиками, соответствующими таковым у животных с активным и пассивным типами поведения.

Впервые выявлено, что повторная трансплантация сингенным реципиентам спленоцитов в ювенильном периоде влияет на показатели иммунитета и нейроэндокринного статуса в отдаленном периоде половозрелости.

Впервые показано, что нейроиммуноэндокринный статус всех сингенных половозрелых реципиентов после трехкратной трансплантации в ювенильном периоде спленоцитов отличается от животных без адоптивного переноса клеток более низкими значениями относительного количества антителообразующих клеток в селезенке, митоген-индуцированной продукции спленоцитами ФНО α и ИЛ-10, более высоким уровнем интрацеребрального ФНО α , ИЛ-1 β в гипоталамусе, тестостерона во фронтальной коре мозга и кортикостерона в сыворотке крови. Установлено также, что определенные отличительные особенности нейроиммуноэндокринного статуса реципиентов детерминированы различиями в функциональном фенотипе трансплантированных клеток.

Впервые показано, что половозрелые сингенные реципиенты после трехкратной трансплантации в ювенильном периоде спленоцитов от особей с активным поведением отличаются от животных контрольной группы без адоптивного переноса клеток показателями функциональной активности иммунной системы (повышенным уровнем реакции ГЗТ, увеличением спонтанной пролиферации и продукции ИФН γ в культурах спленоцитов, при сниженных уровнях антителообразования в селезенке и митоген-стимулированной продукции спленоцитами ИЛ-1 β , ФНО α и ИЛ-10), а также нейроэндокринным фенотипом, характеризующимся увеличением численности особей активного типа поведения с низкой эмоциональной реактивностью на фоне повышенного интрацеребрального уровня ИЛ-10 и ФНО α , ИЛ-1 β в гипоталамусе и стриатуме, умеренно выраженными изменениями концентрации кортикостерона и тестостерона в структурах головного мозга и одновременным возрастанием кортикостерона в сыворотке крови.

Впервые показано, что у сингенных реципиентов после трехкратной трансплантации в ювенильном периоде спленоцитов от особей с пассивным поведением к отдаленному периоду половозрелости формируется нейроиммуноэндокринный фенотип, отличающийся от животных без адоптивного переноса клеток меньшими показателями ответа в реакции ГЗТ, антителообразования в селезенке, пролиферативной активности и продукции ряда цитокинов (ФНО α , ИФН γ , ИЛ-6 и ИЛ-10) в культурах спленоцитов при повышенном уровне активационного апоптоза CD4 $^{+}$ Т-клеток, а также увеличением численности особей с пассивным типом поведения на фоне повышенного уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО α и ИФН γ) и сниженного уровня BDNF в головном мозге, выраженными разнонаправленными изменениями в содержании кортикостерона и тестостерона в структурах мозга и сыворотке крови на фоне выраженного снижения уровня тестостерона в сыворотке.

Впервые установлено, что наибольший эффект повторной трансплантации в ювенильном периоде ИКК на формирование нейроиммуноэндокринного фенотипа к отдаленному периоду половозрелости отмечается при трансплантации спленоцитов от особей с пассивным поведением и проявляется по сравнению с оппозитной группой реципиентов, которым трансплантировали спленоциты доноров с активным типом поведения, снижением показателей иммунитета, доминированием пассивного типа поведения на фоне повышенного содержания в структурах головного мозга провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО α и ИФН γ) и пониженного уровня BDNF, а

также дисбалансом нейроактивных стероидных гормонов кортикостерона и тестостерона в головном мозге и в сыворотке крови с выраженным уменьшением в сыворотке уровня тестостерона.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о влиянии ИКК на формирование нейроиммуноэндокринных функциональных связей в процессе онтогенеза, обеспечивающих поддержание динамического гомеостаза, как в нормальных физиологических условиях, так и при различных патологических состояниях. В результате данной работы выявлены общие закономерности влияния повторной трансплантации ИКК, проведенной в ювенильный период онтогенеза, на формирование у сингенных реципиентов к половозрелому возрасту определенного уровня функциональной активности основных гомеостатических систем организма, проявляющиеся в особенностях нейроиммуноэндокринного статуса, как общих, характерных для всех реципиентов, так и отличительных, детерминированных различным функциональным фенотипом введенных спленоцитов, с наиболее выраженным эффектом после трансплантации ИКК доноров с пассивным типом поведения.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что после проведенной в ювенильном периоде повторной трансплантации ИКК с функциональными характеристиками, свойственными особям с активным либо пассивным типами поведения, в популяции взрослых половозрелых сингенных реципиентов регистрируется преобладающее большинство особей с типом поведения, свойственным мышам-донорам трансплантируемых клеток; при этом сформированный тип поведения сохраняется у реципиентов на дальнейших этапах онтогенеза. Выявленные отличительные особенности количественного содержания регуляторных цитокинов и нейротрофического фактора в головном мозге и его структурах, связанных с реализацией поведенческих реакций, особенности содержания и соотношения нейроактивных стероидных гормонов (кортикостерона и тестостерона) в сыворотке крови и структурах головного мозга, равно как и продемонстрированные особенности функциональной активности иммунной системы и ее клеточных элементов, могут обуславливать характер сформированного типа поведения реципиентов.

При этом комплекс показателей нейроиммуноэндокринного статуса реципиентов после трансплантации ИКК с функциональным фенотипом, характерным для особей с пассивным типом поведения, указывает на снижение в данной группе реципиентов адаптационных возможностей организма с повышенным риском возникновения соматической, неврологической и психической патологии с нейроиммунным компонентом в патогенезе. Выявленные отдаленные эффекты повторной трансплантации ИКК с различными функциональными характеристиками, проведенной в ранний постнатальный период онтогенеза на формирование нейроиммуноэндокринного фенотипа реципиентов к половозрелому возрасту, углубляют знания о механизмах влияния ИКК на развивающийся организм и формирование межсистемных функциональных связей.

Принимая во внимание широкую распространенность иммунологических, гематологических, онкологических заболеваний, выявляемых в том числе и детском возрасте, а также внедрение клеточных технологий в их терапию, полученные результаты служат экспериментальным доказательством важности исследования функционального фенотипа трансплантируемых клеток, оказывающих влияние на формирование основных гомеостатических систем организма и их регуляторную взаимосвязь, позволяя прогнозировать, либо влиять на исход терапии с применением клеточных технологий и последующее качество жизни пациента, что и определяет существенную практическую значимость диссертационной работы. Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе при подготовке лекционного материала и проведении научных семинаров для аспирантов и ординаторов, проходящих обучение в НИИФКИ.

Положения, выносимые на защиту

1. Повторная трансплантация сингенным реципиентам спленоцитов в ювенильном периоде влияет на показатели иммунитета и нейроэндокринного статуса в отдаленном периоде половозрелости.
2. Различия в функциональном фенотипе иммунокомпетентных клеток, трансплантированных в ювенильном периоде от животных с активным и пассивным типом поведения, детерминируют особенности формирования нейроиммуноэндокринного фенотипа у половозрелых реципиентов.
3. Наибольший эффект отмечается при трансплантации спленоцитов от особей с пассивным поведением и проявляется снижением показателей иммунитета, доминированием пассивного типа поведения на фоне повышенного содержания в структурах головного мозга провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО α и ИФН γ), пониженного уровня BDNF, а также дисбалансом нейроактивных стероидных гормонов (кортикостерона и тестостерона) в головном мозге и в сыворотке крови с выраженным уменьшением в сыворотке тестостерона.

Апробация работы

Материалы диссертационной работы были представлены на следующих научных мероприятиях: отчетная конференция аспирантов и интернов ФГБНУ «НИИФКИ» (Новосибирск, 2012); III всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии» (Томск, 2013); седьмая всероссийская научно-практическая конференция «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2015); VIII международная научно-практическая конференция «Теоретические и практические аспекты развития научной мысли: медицинские науки, фармацевтические науки, ветеринарные науки, Биологические науки, Химические науки» (Москва, 2015); IX отчетная научная сессия НИИФКИ «Фундаментальные и клинические аспекты иммунологии» (Новосибирск, 2016); VIII International academic conference «Medical, psychological, educational support for people in extreme climatic, ecological and social conditions» (Turkey, Kemer, 2017); 9nd International academic conference "Human safety in extreme climate environmental and social conditions" (Turkey, Kemer, 2018); IV российская конференция с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии» (Томск, 2018); X International academic conference "Human security in extreme climate- ecological and social conditions" (Turkey, Kemer, 2019).

Личный вклад автора

Работа выполнена в лаборатории нейроиммунологии отдела экспериментальной иммунологии НИИФКИ. Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 27 печатных работ; в том числе 12 статей, из них 9 в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, включая 2 статьи в журналах международной базы данных Web of Science, 15 тезисов в материалах всероссийских и международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация оформлена в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 7.0.11-2011. Материал диссертации изложен на 189 страницах машинописного текста, иллюстрирован 5 рисунками и 16 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Библиографический указатель содержит 393 цитируемых источников (в том числе 141 работа отечественных авторов).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Экспериментальные животные.

Исследование выполнено на мышах-самцах (CBAxС57BL/6)F1 в количестве 646 особей в возрасте 4-5 недель, 3-4-х и 9 месяцев. Животные были получены из лаборатории экспериментальных животных (моделей) НИИФКИ (г. Новосибирск) и из питомника НИЛЭМ (г. Томск). Животные содержались в условиях лабораторного вивария в клетках по 5-10 особей, в течение не менее двух недель до начала эксперимента на стандартной диете, при свободном доступе к воде и «естественном» световом режиме. Содержание экспериментальных животных соответствовало правилам, принятым Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) и правилами лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003, N 267).

2. Исследование ориентировочно-исследовательского поведения животных в тесте «открытое поле»

Для исследования ориентировочно-исследовательского поведения (ОИП) в тесте «открытое поле» [Буреш, 1991] использовалась стандартная установка, которая представляет собой камеру размером 100х100 см, с высокими бортами (40 см). Пол установки расчерчен на равные сектора (10х10см), предназначенные для визуальной регистрации двигательной активности экспериментальных животных. Освещение осуществлялось с помощью бестеневой лампы мощностью 100 Вт, которая расположена над центром поля на высоте 100 см. Животное помещалось в угол камеры, и регистрировалась его моторная и исследовательская активность в течение 5 минут с интервалом в 1 минуту. Для оценки исследовательской активности подсчитывалось количество вертикальных стоек (свободных и пристеночных – с опорой на борт камеры); для оценки моторной активности – количество пересеченных центральных и периферических квадратов. Эмоциональная реактивность определялась по количеству фекальных болюсов. Все эксперименты проводились в период с 10 до 14 часов.

3. Получение суспензии спленоцитов

Животных забивали путем цервикальной дислокации; в стерильных условиях вскрывали брюшную полость, извлекали селезенку, очищали от соединительной ткани и помещали во флаконы с охлажденной до 4°C средой RPMI-1640 (5 мл на селезенку). Выделенные селезенки измельчали на мельчайшие кусочки, осторожно ресуспензировали с помощью шприца для того, чтобы распались оставшиеся скопления клеток, центрифугировали 8 мин при 150g. После удаления надосадочной жидкости, находящиеся в осадке спленоциты ресуспензировали в среде RPMI-1640. Жизнеспособность клеток определяли при помощи окраски трипановым синим.

4. Трансплантация иммунокомпетентных клеток

Иммунокомпетентные клетки (ИКК) для трансплантации выделяли из селезенки мышей – доноров (CBAxС57 В1/6)F1 с активным (высокий уровень ОИП) и пассивным (низкий уровень ОИП) типами поведения в тесте «открытое поле». Далее спленоциты доноров с оппозитивными типами поведения внутривенно вводили мышам-реципиентам, начиная с 4-5 недельного возраста, трехкратно в концентрации 5×10^6 клеток (оптимальная концентрация трансплантируемых клеток была определена в серии предварительных экспериментов) в объеме 0,4 мл среды RPMI-1640 на одно животное с интервалом в 1 неделю. В контрольной группе животным в аналогичных условиях эксперимента вводили среду RPMI-1640.

5. Определение количества антителообразующих клеток в селезенке

Способность мышей к иммунному ответу на эритроциты барана (ЭБ) оценивали на 5-е сутки после внутрибрюшинной иммунизации ЭБ по количеству локальных зон гемолиза в полужидкой среде модифицированным методом A.J. Cunningham [Cunningham, 1965]. Подсчитывали абсолютное число антителообразующих клеток (АОК) на селезенку и

относительное их число на 10^6 ядродержащих клеток селезенки. Подсчет ядродержащих клеток селезенки производили в камере Горяева.

6. Определение высоты реакции гиперчувствительности замедленного типа

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 гиперчувствительности замедленного типа (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 $ИР = (P_o - P_k) / P_k$ и выражали в процентах [Yoshikai, 1979].

7. Определение уровня пролиферативной активности клеток

Пролиферативный ответ спленоцитов оценивали стандартным методом по включению в нуклеопротеидные фракции клеток радиоактивной метки (H^3 -тимидин). Суспензию клеток в полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640, 5% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 10 мМ HEPES-буфера, 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанол (Sigma, USA) и 80 мкг/мл гентамицина вносили в объеме 50 мкл в 96-луночные круглодонные планшеты (Linbro, USA) в концентрации 10^5 спленоцитов на лунку. К суспензии добавляли по 50 мкл митогена (субоптимальные концентрации липополисахарида (ЛПС) *E.coli* 0111:B4 (Sigma, USA) и конкавалина А (КонаА) (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) определялись в серии предварительных экспериментов и составляли соответственно 5 мкг/мл и 3 мкг/мл) и/или культуральной среды до полного объема 150 мкл на лунку. Клетки культивировались в течение 48 часов при 37° С и 5% содержании CO₂ в атмосфере. За 18 часов до окончания периода культивирования вносили H^3 -тимидин (1 мкКи на лунку). По окончании периода инкубации клетки собирали на специальные стекловолокнистые фильтры (Flow Lab. Inc.) с помощью автоматического 12-канального Cell harvester-530 (Flow Lab. Inc.). Оценку радиоактивности материала производили в жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-30 (Intertechinc, Франция). Результаты представлены в виде среднего счета в имп/мин.

8. Определение чувствительности Т-лимфоцитов к активации апоптоза

В исследовании использовали суспензию спленоцитов мышей-реципиентов. Стерильно выделенную на градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,078) лимфоцитарную фракцию спленоцитов ($2 \cdot 10^6$ кл./150,0 мкл обедненной (1% FSC) среды в нативных, индуцированных aCD3 антителами (1мкг/ $2 \cdot 10^5$ кл./150,0 мкл) и стимулированных дексаметазоном (1×10^{-4} М) вариантах помещали в 96-луночный планшет на 96 часов при 37°С и 5% CO₂. Далее производилось поверхностное маркирование клеток моноклональными антителами, различающиеся по спектру эмиссии: aCD8⁺, меченных PE-Cy5 и aCD4⁺, меченных фикоэритрином (PE). После проведения фиксации и пермеабиллизации относительное содержание клеток с гиподиплоидным (апоптотические клетки) набором ДНК определяли по степени флуоресценции внутриядерного красителя 7-актиноаминомицин D(7-AAD). Исследование проводилось на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) с использованием программы BD FACSDiva. Результаты представлены в процентах.

9. Определение субпопуляционного состава спленоцитов

Субпопуляционный состав спленоцитов определялся у 3-х месячных мышей -доноров (CBAxС57Bl/6)F1 с активным и пассивным типами ОИП. Фенотипирование клеток селезенки проводилось методом проточной цитофлуорометрии с помощью аналитической системы FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) согласно инструкции по эксплуатации, прилагаемой к прибору, с моноклональными антителами против CD3⁺; CD4⁺; CD8⁺; CD19⁺; CD14⁺; CD115⁺ (Becton Dickinson, USA), помеченными флюорохромами с отличающимися спектрами эмиссии.

10. Определение количественного содержания цитокинов

Количественное содержание цитокинов определяли в образцах культуральных супернатантов спленоцитов, а также в лизатах селезенки и структур головного мозга

половозрелых реципиентов в 3-х месячном возрасте. Для определения содержания цитокинов в супернатантах спленоциты культивировали в концентрации 2×10^6 /мл в объеме 2 мл в 24-луночных планшетах для иммунологических исследований (Libro, USA) в полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 10 мМ HEPES-буфера и 80 мкг/мл гентамицина в течение 24 часов для исследования продукции ИЛ-1 β и ФНО α ; 48 часов для ИЛ-10 и ИЛ-6 и 72 часов для оценки продукции спленоцитами ИФН- γ . Для исследования митоген-стимулированной продукции цитокинов клетками селезенки в культуральную среду добавляли ЛПС *E.coli* 011:B4 (Sigma) для ИЛ-1 β , ФНО α и ИЛ-6, и КонА (Sigma) – для ИФН- γ и ИЛ-10 в концентрациях, стимулирующих субоптимальную продукцию каждого из цитокинов, определенную в серии предварительных экспериментов. По окончании культивирования клеточную суспензию собирали, клетки осаждали центрифугированием, а культуральный супернатант использовали для исследования.

Лизаты селезенки, головного мозга/структур головного мозга получали путем гомогенизирования тканей в среде RPMI-1640 с добавлением 0,1% Triton X-100 (GERBU Biotechnik GmbH), с последующим центрифугированием в течение 3 минут при 10000 оборотов/мин. Надосадочную жидкость использовали для исследования.

Содержание цитокинов в исследуемых образцах оценивали методом ИФА (ELISA) с использованием специфических тест – систем “eBioscience” (BenderMedSystems, Austria) для определения ИФН- γ , ИЛ-6 и «R&D Systems Inc.» (USA) для определения ИЛ-1 β , ИЛ-7, ИЛ-10, ФНО- α в соответствии с инструкцией фирм-производителей. Оптическую плотность исследуемых образцов измеряли при помощи спектрофотометра с вертикальным прохождением света Anthos 2020 («AnthosLabtec», Austria) при длине волны 450 нм.

11. Определение количественного содержания нейротрофического фактора в головном мозге

Количественное содержание нейротрофического фактора BDNF в головном мозге мышей-реципиентов определяли в лизатах его структур, для которых показана наиболее выраженная экспрессия фактора (гиппокамп, фронтальная кора) методом ИФА с использованием специфической тест – системы «R&D Systems Inc.» (USA) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

12. Определение уровня нейроактивных стероидных гормонов в сыворотке крови и в головном мозге

Количественное содержание нейроактивных стероидных гормонов (кортикостерона и тестостерона) в лизатах головного мозга и его структур (фронтальная кора, гипоталамус, гиппокамп, стриатум) мышей-реципиентов определяли методом ИФА с использованием специфических тест – систем Bio-Rad (Germany) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

13. Статистическая обработка результатов

Для проведения статистической обработки фактического материала применяли методы статистического анализа с использованием программных пакетов анализа «Statistica 10» for Windows (StatSoft, USA). При анализе количественных данных проверку на нормальность распределения фактических данных проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка. При проведении сравнений независимых выборок, в случае нормального распределения и равных дисперсий в группах применяли t-критерий Стьюдента; при отклонении распределения от нормального применяли критерий Манна-Уитни. Различия частот в независимых группах анализировались с помощью точного критерия Фишера. Для множественного сравнения показателей использовали критерий Крускала - Уоллиса. Для оценки взаимосвязи между параметрами проводился корреляционный анализ. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимался $p \leq 0,05$. Объем выполненных исследований позволял оценить результаты с достоверностью 95-99% при использовании соответствующих статистических методов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн исследования

По результатам оценки ОИП половозрелых 3-х месячных мышей были выделены две группы животных-доноров – с активным и пассивным типами поведения. Сингенным реципиентам, начиная с 4-5 недельного возраста, проводилась трехкратная еженедельная трансплантация спленоцитов доноров с активным (группа 1) либо пассивным (группа 2) типами поведения. Контрольной группе мышей в аналогичных условиях эксперимента вводилась среда RPMI-1640. У животных-реципиентов и мышей контрольной группы по достижении половозрелого трехмесячного возраста проводилась оценка показателей нейроиммуноэндокринного статуса. Исследуемые показатели иммунитета: гуморальный и клеточный иммунный ответ *in vivo*, пролиферативная активность спленоцитов, уровень апоптоза и продукция цитокинов *in vitro*; исследуемые показатели нейроэндокринного статуса: параметры ОИП, интрацеребральный уровень цитокинов и BDNF, а также концентрации нейроактивных стероидных гормонов кортикостерона и тестостерона в сыворотке крови и в головном мозге.

Характеристика трансплантируемых клеток

Для трансплантации использовались спленоциты половозрелых мышей-самцов (CBA x C57BL/6)F1 с оппозитными (активным и пассивным) типами ОИП. Показано, что указанные клетки различны:

- а) по экспрессии поверхностных рецепторов: спленоциты мышей с активным типом поведения демонстрировали более низкий уровень CD3+ (29 (27÷35) и 38 (37÷39); $p < 0,05$) и более высокий уровень CD14-/115+ (6 (5÷7) и 4 (3÷4); $p < 0,05$) по сравнению с таковыми у мышей с пассивным типом поведения;
- б) по пролиферативной активности, более высокий уровень которой (как спонтанной, так и митоген-индуцированной) характерен для спленоцитов мышей с активным типом поведения, что было показано ранее и подтверждено в собственных исследованиях.

Полученные результаты согласуются с данными других авторов о различном функциональном фенотипе спленоцитов мышей-самцов (CBAxC57BL/6)F1 с активным и пассивным типами поведения в «открытом поле», для которых было также показано, различие по пролиферативной активности, экспрессии генов, синтезу и продукции ряда цитокинов [Correa, 1999; Medina, 1999; Pawelec, 1999; Viveros, 2001; Markova, 2000 – 2014].

Показатели иммунного статуса половозрелых мышей-реципиентов после трансплантации в ювенильном периоде иммунокомпетентных клеток от сингенных доноров с активным и пассивным типом поведения

Пролиферативная активность спленоцитов мышей-реципиентов

Показано, что после трансплантации ИКК доноров с пассивным типом поведения у сингенных реципиентов выявлены более низкие значения спонтанной и КонА-индуцированной пролиферативной активности спленоцитов по сравнению с соответствующими показателями в контрольной группе мышей без адоптивного переноса клеток; реципиенты после трансплантации спленоцитов доноров с активным типом поведения демонстрировали более высокие показатели спонтанной и Кон А-индуцированной пролиферативной активности по сравнению с соответствующими показателями в группе контрольных мышей и реципиентов после трансплантации клеток от доноров с пассивным типом поведения. При этом различий в уровне ответа селезеночных лимфоцитов всех реципиентов на В-клеточный митоген (ЛПС) не выявлено (таблица 1).

Таблица 1 – Пролиферативная активность (имп/ мин) спленоцитов половозрелых мышей-реципиентов CBAxC57BL/6)F1 после проведенной в ювенильном периоде трансплантации сингенных спленоцитов от доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типом поведения.

Пролиферативная активность	Группы животных		
	Контроль (n=36)	Группа 1 (n=45)	Группа 2 (n=45)

Спонтанная	496,0 (276,0÷796,0)	562,5(444,5÷1909,5) *	264,0 (163,0÷593,0) * ##
Кон А	16944,0(12001,0÷19230,0)	14560,0(10192,0÷18848,0)	11216,0 (7923,0÷15106,0) **#
ЛПС	23563,0(16520,5÷27542,0)	24805,0(18194,0÷30806,0)	26175,0(20051,0÷30078,0)

Примечание: результаты представлены в виде Ме (Q1–Q3); * - $p \leq 0,05$; ** - $p < 0,01$ по сравнению с соответствующим показателем в группе контроля; # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$ между соответствующими показателями в 1 и 2 группах реципиентов.

Уровень апоптоза лимфоцитов в культурах клеток селезенки мышей-реципиентов

Установлено, что у половозрелых сингенных реципиентов после трансплантации в ювенильном периоде спленоцитов доноров с пассивным типом поведения, доля апоптоза CD4⁺ - клеток, находящихся в условиях обедненной культуральной среды ниже по сравнению с таковой у контрольных животных; при этом в указанной группе мышей выявлен более высокий уровень апоптоза в присутствии aCD3 и при дополнительной стимуляции дексаметазоном (таблица 2).

Таблица 2 – Уровень апоптоза CD4⁺ (% от общего числа CD4⁺) лимфоцитов в культурах клеток селезенки половозрелых мышей-реципиентов CBAxС57Bl/6)F1 после проведенной в ювенильном периоде трансплантации сингенных спленоцитов от доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типом поведения.

Группы животных	Спонтанный	aCD3	Дексаметазон
Контроль	40.1 (39.2-41.7)	10.6 (9.5-12.3)	28.3 (26.7-30.2)
Группа 1	38.7 (34.9-42.1)	10.4 (9.8-12.0)	22.4 (20.0-28.3)
Группа 2	31.6 (25.5-38.2) *	16.0 (15.2-17.1) *	31.8 (30.6-34.1) *

Примечание: результаты представлены в виде Ме (Q1–Q3); n= 9 в каждой группе животных; * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе; # - $p < 0,05$ между соответствующими показателями в 1 и 2 группах реципиентов.

Показано также значимое снижение доли апоптоза CD8⁺ - клеток, находящихся в условиях обедненной культуральной среды в группе сингенных реципиентов после трансплантации спленоцитов доноров с пассивным типом поведения, относительно контрольной группы и группы животных после трансплантации клеток от доноров с активным типом поведения (таблица 3).

Таблица 3 – Уровень апоптоза CD8⁺ (% от общего числа CD8⁺) лимфоцитов в культурах клеток селезенки половозрелых мышей-реципиентов CBAxС57Bl/6)F1 после проведенной в ювенильном периоде трансплантации сингенных спленоцитов от доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типом поведения.

Группы животных	Спонтанный	антиCD3	Дексаметазон
Контроль	45.8 (43.5-48.3)	6.9 (6.2-7.8)	28.0 (25.9-31.1)
Группа 1	47.5 (45.6-50.2)	5.2 (4.6-7.1)	27.9 (22.7-33.0)
Группа 2	30.2 (28.9-32.6) **	6.7 (6.1-8.3)	36.3 (35.3-39.2)

Примечание: результаты представлены в виде Ме (Q1–Q3); n= 9 в каждой группе животных; * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе; # - $p < 0,05$, между соответствующими показателями в 1 и 2 группах реципиентов.

Интенсивность гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей-реципиентов

Выявлено, что все половозрелые сингенные реципиенты после повторных трансплантаций в ювенильном периоде ИКК характеризуются сниженным гуморальным иммунным ответом, оцененным по относительному количеству АОК селезенки. При этом, показаны более высокие значения АОК (как относительные, так и абсолютные) в группе реципиентов, которым вводились спленоциты доноров с активным типом поведения по сравнению с реципиентами после трансплантации клеток от доноров с пассивным типом поведения (таблица 4).

Установлено также, что повторная трансплантация в ювенильном периоде ИКК влияет на интенсивность клеточного иммунного ответа половозрелых реципиентов, оцененного по высоте реакции ГЗТ, причем характер указанного влияния зависел от

функционального фенотипа введенных спленоцитов. Так, относительно мышей без адоптивного переноса клеток, уровень реакции ГЗТ реципиентов был более высоким после трансплантации спленоцитов доноров с активным типом поведения и более низким после введения ИКК доноров с пассивным поведением (таблица 4).

Таблица 4 – Интенсивность гуморального и клеточного иммунного ответа у половозрелых мышей-реципиентов СВАхС57Вl/6)F1, после проведенной в ювенильном периоде трансплантации сингенных спленоцитов от доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типом поведения.

	Группа 1 (n=26)	Группа 2 (n=19)	Контроль (n=29)
Относительное число АОК (АОК/10 ⁶)	107,8 (64,1÷181,7) *#	64,5 (46,8÷90,2) *	161,1 (126,9÷187,9)
Абсолютное число АОК	21397,5 (12900,1÷44715,7) #	12695,3 (8580,0÷25185,1) *	34312,5 (20331,2÷43103,5)
Уровень реакции ГЗТ (%)	36,8 (31,6÷47,4) *#	16,7 (14,3÷20,0) *	23,8 (20,0÷27,8)

Примечание. результаты представлены в виде Ме (Q1–Q3); *- p <0,05 по сравнению с соответствующими показателями в группе контроля; # - p <0,05 между соответствующими показателями в 1 и 2 группах реципиентов.

Следовательно, трёхкратно трансплантированные в ювенильном периоде ИКК оказывают модулирующее влияние на пролиферативную активность, чувствительность к активационному апоптозу лимфоцитов и интенсивность иммунного ответа в отдаленном периоде половозрелости.

Продукция цитокинов спленоцитами мышей-реципиентов

В результате проведенных исследований выявлены особенности продукции цитокинов клетками селезенки половозрелых сингенных реципиентов после проведенной в ювенильном периоде трехкратной трансплантации ИКК с различным функциональным фенотипом. Спленоциты реципиентов после повторного введения иммунных клеток от доноров с активным типом поведения относительно спленоцитов животных без адоптивного переноса клеток характеризовались более высоким уровнем спонтанной продукции ИФН γ , при более низком уровне стимулированной продукции ИЛ-1 β , ФНО α , ИЛ-10 и спонтанной продукции ФНО α (таблица 5).

Таблица 5 – Продукция цитокинов (пг/мл) клетками селезенки половозрелых мышей-реципиентов (СВАхС57Вl/6)F1 после проведенной в ювенильном периоде трансплантации сингенных спленоцитов от доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типом поведения.

	Контроль (n=10)	Группа 1 (n=12)	Группа 2 (n=12)
<i>Спонтанная</i>			
ИЛ-1 β	3,37 (2,97 ÷ 3,58)	4,2 (1,58 ÷ 4,59)	3,38 (3,17 ÷ 3,98)
ИЛ-6	44,8 (16,6 ÷ 48,3)	25,8 (17,03 ÷ 26,7)	10,43 (6,04 ÷ 17,03) # *
ИЛ-10	32,66 (10,4 ÷ 36,4)	32,7 (23,01 ÷ 76,5)	6,7(2,97 ÷ 58,6)
ФНО α	13,11 (4,29 ÷ 30,14)	1,97(0,81 ÷ 2,74) #*	9,28 (7,75 ÷ 9,28)
ИФН γ	3,8 (3,63 ÷ 5,29)	11,17(5,14 ÷ 34,6) #*	1,39 (1,37 ÷ 1,89) *
<i>Стимулированная митогенами</i>			
ИЛ-1 β	7,06 (6,64 ÷ 10,2)	5,2 (4,99 ÷ 6,64) #*	9,58 (8,31 ÷ 11)
ИЛ-6	1440,0 (1300,0 ÷ 1580,0)	1370,0 (1350,0 ÷ 1400,0)	1170,0 (1140,0 ÷ 1440,0) *
ИЛ-10	295,4 (249,4 ÷ 328,8)	60,9 (41,6 ÷ 79,4) #*	200,4(103,2÷280,6) *
ФНО α	309,4(272,02 ÷ 361,7)	140,3(89,9 ÷ 145,8) *	225,2 (136,04÷283,9) *
ИФН γ	89,4 (87,4 ÷ 91,7)	87,6 (87,3 ÷ 87,7)	86,3 (85,9 ÷ 91,3)

Примечание: контроль – группа мышей соответствующего возраста, которым в аналогичных условиях эксперимента вводили среду RPMI 1640; результаты представлены в виде Ме (Q1–Q3); * - p <0,05 по сравнению с соответствующим показателем в группе контроля; # - p <0,05 между соответствующими показателями в 1 и 2 группах реципиентов.

При исследовании количественного содержания цитокинов в культуральных супернатантах спленоцитов реципиентов после повторной трансплантации ИКК доноров с пассивным типом поведения, выявлена более низкая спонтанная продукция ИЛ-6, ИФН γ , а также митоген-стимулированная продукция ИЛ-6, ФНО α и ИЛ-10 по сравнению с таковыми у контрольных мышей без адоптивного переноса клеток.

Между группами реципиентов также выявлены различия в продукции цитокинов спленоцитами, проявляющиеся в более низкой спонтанной продукции ИЛ-6, ИФН γ при более высокой спонтанной продукции ФНО α и стимулированной митогенами продукции ИЛ-1 β и ИЛ-10 в группе реципиентов, которым вводили ИКК доноров с пассивным типом поведения (таблица 5).

Следовательно, ИКК, трёхкратно трансплантированные в ювенильном периоде, оказывают модулирующее влияние на уровень продукции ряда цитокинов спленоцитами у сингенных реципиентов в отдаленном периоде половозрелости.

Таким образом, в условиях *in vivo* и *in vitro* установлено, что проведенная в ювенильном периоде повторная трансплантация ИКК влияет на формирование к половозрелому возрасту иммунного фенотипа, при этом показатели иммунитета у половозрелых реципиентов после трансплантации спленоцитов от доноров с активным и пассивным типом поведения различны и детерминированы функциональной активностью трансплантированных клеток.

Показатели нейроэндокринного статуса половозрелых мышей-реципиентов после трансплантации в ювенильном периоде иммунокомпетентных клеток от сингенных доноров с активным и пассивным типом поведения

Параметры ориентировочно-исследовательского поведения реципиентов

Исследование поведения в «открытом поле» половозрелых сингенных реципиентов после трехкратной трансплантации в ювенильном периоде спленоцитов от доноров с активным типом поведения выявил 2,5 - кратное увеличение в популяции доли животных с активным типом поведения (28,4 % и 11,6 % соответственно) и 9 - кратное снижение процентного содержания особей с пассивным типом поведения (2,5 % и 24,1 % соответственно) относительно контрольной группы мышей, которые не подвергались трансплантации ИКК.

При исследовании параметров ОИП указанной группы реципиентов были зарегистрированы относительно высокие показатели горизонтальной двигательной активности, отражающие моторный компонент поведения, при низкой эмоциональной реактивности, оцененной по количеству фекальных болюсов (таблица 6).

Таблица 6 – Параметры ориентировочно-исследовательского поведения половозрелых мышей-реципиентов (CBAx57Bl/6)F1 после проведенной в ювенильном периоде трансплантации сингенных спленоцитов от доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типом поведения

Показатель	Группа 1 (n=48)	Группа 2 (n=40)	Контроль (n=42)
Горизонтальная двигательная активность			
Периферическая	150,5(84,5÷191,5) *	75(25÷122,5) *	125,5(73÷170)
Центральная	2,0 (0÷7,5)	0 (0÷0)	0 (0÷3)
Суммарная	157(84,5÷200,5) *	75 (25÷122,5) *	125,5 (73÷172)
Вертикальная двигательная активность			
Пристеночные стойки	6(3÷10)	3 (1÷5) *	5,5(4÷9)
Свободные стойки	1(0÷2)	0(0÷0) *	0(0÷1)
Суммарная	6(4÷12)	3(1÷6) *	6(4÷11)
Эмоциональная реактивность			
Количество фекальных болюсов	2(1÷4) *	3(1,5÷4)	3(2÷5)

Примечание: результаты представлены в виде Ме (Q1–Q3); контроль - группа мышей соответствующего возраста, которым в аналогичных условиях эксперимента вводили среду RPMI-1640; * - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующими показателями в группе контроля.

В популяции сингенных реципиентов после трансплантации спленоцитов от доноров с пассивным типом поведения 1,5-кратно увеличилось процентное содержание особей с пассивным поведением (36,6 % и 24,1 % соответственно) при 4-кратном снижении процентного содержания особей с активным типом поведения (2,8 % и 11,6 % соответственно) по сравнению с таковым у контрольных мышей аналогичного возраста без адоптивного переноса клеток.

Сравнительный анализ поведенческого фенотипа представителей двух групп половозрелых сингенных реципиентов показал, что после введения спленоцитов доноров с пассивным поведением относительно оппозитной группы реципиентов регистрировалось 14-кратное увеличение процентного содержания животных с аналогичным донорам клеток пассивным типом поведения (36,6 % и 2,5 % соответственно во 2 и 1 группах реципиентов) и 10-кратное снижение доли животных с активным типом поведения (2,8 % и 28,4 % соответственно); при этом все показатели, отражающие, как моторный, так и исследовательский компоненты ОИП, кроме эмоциональной реактивности, в группе реципиентов после трансплантации спленоцитов от доноров с пассивным типом поведения имели низкие значения (таблица 6).

Исследование поведения в «открытом поле» всех реципиентов в возрасте 9 месяцев показало, что поведенческий фенотип, сформированный к 3-х месячному возрасту, сохранялся на дальнейших этапах онтогенеза, что демонстрирует возможность направленного формирования поведенческого фенотипа путем трансплантации клеток иммунной системы с определенными функциональными характеристиками.

Следовательно, после проведенной в ювенильный период трехкратной трансплантации ИКК с различным функциональным фенотипом, характерным для особей с активным либо пассивным типом поведения, у сингенных реципиентов к половозрелому возрасту формируется преимущественно тип поведения, аналогичный животным-донорам клеток, который сохраняется на дальнейших этапах онтогенеза.

Содержание цитокинов в головном мозге мышей-реципиентов

Принимая во внимание существенную роль цитокинов (как периферического, так и центрального происхождения) в реализации поведенческих реакций было исследовано количественное содержание паттерна цитокинов в головном мозге половозрелых 3-х месячных мышей-реципиентов после проведенной в ювенильный период трехкратной трансплантации ИКК с различными функциональными характеристиками, свойственными мышам с активным либо пассивным типом поведения. При этом, после трансплантации спленоцитов от доноров с активным типом поведения в головном мозге реципиентов выявлен относительно высокий уровень ФНО α и ИЛ-10 по сравнению с таковыми в контрольной группе животных без адоптивного переноса клеток (таблица 7).

Таблица 7 – Уровень цитокинов (пг/мл) в головном мозге половозрелых мышей-реципиентов (СВАхС57В1/6)F1 после проведенной в ювенильном периоде трансплантации сингенных спленоцитов от доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типом поведения

	Группа 1	Группа 2	Контроль
ИЛ-1 β	15,04 (14,3 ÷ 18,2)	33,8 (18,4 ÷ 54,7) #	26,04 (12,9 ÷ 49,2)
ИЛ-10	22,9 (17,3 ÷ 63,6) *	4,9 (2,1 ÷ 40,5)	7,4 (2,0 ÷ 17,9)
ИФН- γ	2049,8 (1704,7 ÷ 2218,5)	2205,0 (2095,5 ÷ 2322,5) # *	1975,8 (1832,4 ÷ 2103,4)
ФНО α	58,7 (1,71 ÷ 118,9) *	41,7 (0,91 ÷ 141,9) *	5,3 (2,0 ÷ 25,9)
ИЛ-7	81,1 (44,7 ÷ 261,6)	189,7 (33,5 ÷ 515,7)	73,4 (29,7 ÷ 172,1)

Примечание: результаты представлены в виде Ме (Q1–Q3); * - $p \leq 0,05$ - по сравнению с соответствующими показателями в группе контроля; # - $p < 0,05$ – между соответствующими показателями в 1 и 2 группах реципиентов.

У половозрелых реципиентов после повторного введения в ювенильном периоде спленоцитов от доноров с пассивным типом поведения, регистрировалось более высокое содержание в головном мозге ИФН γ и ФНО α относительно таковых в контрольной группе животных; при этом содержание указанных провоспалительных цитокинов, а также ИЛ-1 β выше, чем в головном мозге оппозитной группы реципиентов, которым трансплантировали ИКК от доноров с активным типом поведения (таблица 7). Учитывая существенную роль ИЛ-1 β центрального происхождения в реализации и регуляции поведенческих реакций и, в частности ОИП, было также исследовано содержание указанного цитокина в отдельных структурах головного мозга, значимых в реализации указанного поведения (фронтальной коре, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме). При этом показано, что после повторной

трансплантации ИКК от доноров с активным типом поведения у реципиентов выявлено более высокое содержание ИЛ-1 β в гипоталамусе и стриатуме по сравнению с соответствующими показателями в группе животных без адоптивного переноса клеток (таблица 8).

Таблица 8 – Содержание ИЛ-1 β (пг/мл) в структурах головного мозга половозрелых мышей-реципиентов (CBAxС57Bl/6)F1 после проведенной в ювенильном периоде трансплантации сингенных спленоцитов от доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типом поведения

Структура	Группа 1	Группа 2	Контроль
Фронтальная кора	6,2 (3,44 \div 9,3)	15,04 (9,9 \div 17,6) *#	4,5 (3,7 \div 6,6)
Гипоталамус	2,1 (1,6 \div 5,25) *	7,8 (2,5 \div 43,4) *	1,4 (1,1 \div 1,65)
Стриатум	5,4 (4,6 \div 18,4) *	3,1 (1,9 \div 20,0)	2,9 (1,5 \div 4,7)
Гиппокамп	29,7 (23,9 \div 30,4)	30,4 (18,1 \div 38,8)	24,3 (21,3 \div 39,4)

Примечание: результаты представлены в виде Ме (Q1–Q3); контроль – группа мышей соответствующего возраста, которым в аналогичных условиях эксперимента вводили среду RPMI 1640; * - $p < 0,05$ относительно соответствующего показателя в группе контроля; # - $p < 0,05$ - между соответствующими показателями в 1 и 2 группах реципиентов; $n = 8$ в каждой группе.

У реципиентов после введения спленоцитов от доноров с пассивным типом поведения, выявлено более высокое содержание ИЛ-1 β в гипоталамусе относительно такового у мышей контрольной группы, а также во фронтальной коре относительно контрольных животных и оппозитной группы реципиентов (таблица 8).

Содержание нейротрофического фактора BDNF в головном мозге реципиентов

Нейротрофические факторы играют ключевую роль в развитии, дифференцировке, синаптогенезе, выживании нейронов мозга и в процессах их адаптации к внешним воздействиям, вовлекаясь при этом в регуляцию различных форм поведения. Установлено, что после проведенной в ювенильном периоде трехкратной трансплантации спленоцитов от доноров с пассивным типом поведения у половозрелых сингенных реципиентов количественное содержание BDNF снижено во фронтальной коре на 27,6 % и в гиппокампе на 34 % по сравнению с таковыми в контрольной группе животных, не подвергавшихся введению ИКК. У реципиентов, которым трансплантировали клетки от доноров с активным типом поведения, обозначенные выше показатели сопоставимы с таковыми в контрольной группе мышей соответствующего возраста без адоптивного переноса клеток (таблица 9).

Таблица 9 – Содержание BDNF (пг/мл) в структурах головного мозга половозрелых мышей-реципиентов (CBAxС57Bl/6)F1 после проведенной в ювенильном периоде трансплантации сингенных спленоцитов от доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типом поведения

Структура мозга	Группа 1	Группа 2	Контроль
Фронтальная кора	219,5 \pm 95,3	171,2 \pm 61,3	236,3 \pm 87,9
Гиппокамп	567,3 \pm 134,1	389,5 \pm 117,3*	589,9 \pm 102,4

Примечание: результаты представлены в виде ($M \pm SD$); контроль – группа мышей соответствующего возраста, которым в аналогичных условиях эксперимента вводили среду RPMI 1640; *- $p < 0,05$ относительно контрольной группы и второй группы реципиентов; $n = 8$ в каждой группе.

Содержание нейроактивных стероидных гормонов в головном мозге реципиентов

В проведенных исследованиях установлены особенности содержания нейроактивных стероидных гормонов в головном мозге и его отдельных структурах у половозрелых реципиентов после трехкратной трансплантации в ювенильном периоде ИКК. Так, для всех реципиентов характерен более высокий интрацеребральный уровень кортикостерона относительно такового у мышей без адоптивного переноса клеток (таблица 10).

Таблица 10 – Содержание кортикостерона (пг/мл) в структурах головного мозга половозрелых мышей-реципиентов (CBAxС57Bl/6)F1 после проведенной в ювенильном периоде трансплантации сингенных спленоцитов от доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типом поведения

Структура	Группа 1	Группа 2	Контроль
Цельный мозг	8 (7,9 \div 8,1) *#	4,1 (4,0 \div 4,2) *	3,2 (3,0 \div 3,4)
Фронтальная кора	4,4 (4,0 \div 4,9) #	2,55 (2,4 \div 3,0) *	5,1 (4,7 \div 5,3)
Гипоталамус	3,1 (2,4 \div 3,6)	3,6 (3,3 \div 4,0) *	2,75 (2,1 \div 3,5)

Стриатум	5,2 (4,1 ÷ 6,3) *#	3,3 (2,9 ÷ 3,8)	3,9 (3,4 ÷ 4,5)
Гиппокамп	7,8 (5,5 ÷ 9,9) *#	4,0 (3,7 ÷ 4,5)	3,8 (2,4 ÷ 5,4)

Примечание: результаты представлены в виде Me (Q1–Q3); * - $p < 0,05$ относительно контрольной группы, # - $p < 0,05$ относительно второй группы реципиентов; $n = 8$ в каждой группе.

При этом, у реципиентов после трансплантации спленоцитов от доноров с активным типом поведения повышенное содержание кортикостерона в мозге обусловлено его относительно высокой концентрацией в гиппокампе и стриатуме, в то время как у оппозитной группы реципиентов (доноры с пассивным поведением) – более высоким уровнем гормона в гипоталамусе и низким во фронтальной коре (таблица 10).

Исследование уровня тестостерона в головном мозге реципиентов, получавших ИКК от доноров с активным типом поведения, выявило более низкий уровень гормона в гипоталамусе при более высоком его содержании во фронтальной коре и гиппокампе относительно контрольных животных. При этом регистрировалась сниженная концентрация тестостерона в гипоталамусе и повышенная в стриатуме и гиппокампе по сравнению с таковыми у оппозитной группы реципиентов, которым проводилась трансплантация спленоцитов от доноров с пассивным типом поведения. Последние, в свою очередь, характеризовались более высоким уровнем тестостерона во фронтальной коре, при его низком содержании в стриатуме относительно таковых у животных, достигших половозрелого возраста без адоптивного переноса клеток (таблица 11).

Таблица 11 – Содержание тестостерона (пг/мл) в структурах головного мозг половозрелых мышей-реципиентов (CBAx57Bl/6)F1 после проведенной в ювенильном периоде трансплантации сингенных спленоцитов от доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типом поведения.

Структура	Группа 1	Группа 2	Контроль
Цельный мозг	1,2 (1,0 ÷ 1,4)	1,3 (1,1 ÷ 1,5)	1,3 (1,0 ÷ 1,6)
Фронтальная кора	1,6 (1,5 ÷ 1,7) *	1,95 (1,5 ÷ 2,4) *	1,15 (1,1 ÷ 1,3)
Гипоталамус	1,5 (1,3 ÷ 1,7) *#	2,6 (2,1 ÷ 3,1)	3,1 (1,7 ÷ 4,3)
Стриатум	3,85 (3,8 ÷ 4,0) #	1,55 (1,5 ÷ 1,7) *	3,45 (2,7 ÷ 4,3)
Гиппокамп	5,5 (5,3 ÷ 5,8) *#	2,95 (2,8 ÷ 3,1)	2,15 (1,3 ÷ 3,0)

Примечание: результаты представлены в виде Me (Q1–Q3); * - $p < 0,05$ относительно контрольной группы, # - $p < 0,05$ между соответствующими показателями в 1 и 2 группах реципиентов.; $n = 8$ в каждой группе.

Следовательно, показано модулирующее влияние повторной трансплантации в ювенильном периоде ИКК на интрацеребральный уровень у сингенных реципиентов к половозрелому возрасту ряда цитокинов, BDNF и нейроактивных стероидных гормонов, что может опосредовать формирование определенного поведенческого фенотипа.

Содержание нейроактивных стероидных гормонов в сыворотке крови реципиентов

Установлено, что после трехкратной трансплантации ИКК с различным функциональным фенотипом, проведенной в ювенильный период, половозрелые реципиенты характеризовались отличительными особенностями содержания и соотношения кортикостерона и тестостерона в сыворотке крови. Показано, в частности, что у животных, выросших в условиях повторной трансплантации спленоцитов от доноров с активным типом поведения, в половозрелом возрасте относительно контрольной группы животных, не подвергавшихся введению ИКК, в сыворотке крови регистрировался более высокий уровень кортикостерона, и отмечалась выраженная тенденция к повышению уровня тестостерона (таблица 12).

Таблица 12 – Содержание кортикостерона и тестостерона (пг/мл) в сыворотке крови половозрелых мышей-реципиентов (CBAx57Bl/6)F1 после проведенной в ювенильном периоде трансплантации сингенных спленоцитов от доноров с активным (группа 1) и пассивным (группа 2) типом поведения ($M \pm SD$).

Группа животных	кортикостерон	тестостерон	кортикостерон/тестостерон
Контроль	352,49 ± 12,67	6,34 ± 0,37	56
Группа 1	474,1 ± 27,59**	7,19 ± 0,53#	66
Группа 2	481,71 ± 22,2**	4,39 ± 0,28**	110

Примечание: n=8 в каждой группе животных; ** - $p < 0,01$ по сравнению с соответствующими показателями в группе контроля; # - $p < 0,01$ между соответствующими показателями в 1 и 2 группах реципиентов.

В группе реципиентов, выросших в условиях повторной трансплантации спленоцитов от доноров с пассивным типом ОИП, также наблюдался повышенный уровень кортикостерона относительно такового в контрольной группе мышей, однако, при этом регистрировался низкий уровень тестостерона (таблица 12).

Важным для физиологической адаптации является баланс гормонов, то есть индексы соотношения гормонов. Показано, что у реципиентов, после трансплантации спленоцитов с функциональной активностью, характерной для особей с активным типом поведения, равно как и в контрольной группе мышей без адоптивного переноса ИКК, индексы соотношения кортикостерон / тестостерон сходны, несмотря на различия в уровнях гормонов. В случае если донорами клеток выступали мыши с пассивным типом поведения, у реципиентов регистрировалось резкое отличие в гормональном балансе: почти на 50% выше индекс соотношения указанных гормонов, благодаря значительному снижению уровня тестостерона (таблица 12), что указывает с физиологической точки зрения на гормональный дисбаланс/напряжение.

Следовательно, реципиенты после повторной трансплантации спленоцитов от доноров с активным типом поведения, судя по индексам соотношения нейроактивных стероидных гормонов в сыворотке крови, находятся в относительно стабильном состоянии в отличие от мышей, выросших в условиях трансплантации ИКК с функциональных фенотипом, характерным для животных с пассивным типом ОИП.

Таким образом, установлено, что проведенная в ювенильном периоде трехкратная трансплантация ИКК влияет на формирование к половозрелому возрасту нейроэндокринного фенотипа реципиентов, особенности которого детерминированы различной функциональной активностью трансплантированных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что ИКК, трехкратно введенные в организм в раннем постнатальном онтогенезе, оказывают модулирующее влияние на процесс формирования определенного уровня функциональной активности основных гомеостатических систем организма, что проявляется в особенностях нейроиммуноэндокринного статуса реципиентов во взрослом, половозрелом, возрасте и свидетельствует об отдаленных эффектах клеточной трансплантации. Полученные результаты позволяют выявить закономерности влияния повторной трансплантации ИКК, проведенной в ювенильном периоде, на формирование у сингенных реципиентов к половозрелому возрасту иммунного и нейроэндокринного фенотипов, проявляющиеся в наличии как их общих, характерных для всех реципиентов особенностей, так и отличительных, детерминированных различной функциональной активностью донорских клеток.

Так, все реципиенты, после проведенной в ювенильном периоде трехкратной трансплантации ИКК, в отдаленном периоде половозрелости характеризуются со стороны иммунной системы сниженным гуморальным иммунным ответом, оцененным по относительному количеству АОК селезенки, более низкой митоген- индуцированной продукцией спленоцитами цитокинов ФНО α и ИЛ-10. Нейроэндокринный фенотип всех половозрелых реципиентов отличается более высоким уровнем интрацеребрального ФНО α , более высоким содержанием ИЛ-1 β в гипоталамусе, тестостерона во фронтальной коре, равно как и более высоким уровнем кортикостерона в сыворотке крови. При этом, в популяции выросших реципиентов наблюдается перераспределение соотношения особей с различным уровнем ОИП в сторону значительного увеличения числа животных с типом поведения, аналогичным таковому у мышей-доноров клеток.

Особенностями иммунного статуса сингенных реципиентов после повторной трансплантации ИКК доноров с активным типом поведения являются повышенный

клеточный иммунный ответ на антигенное воздействие, более высокая спонтанная пролиферация и продукция ИФН γ в культурах спленоцитов, при сниженном антителообразовании в селезенке и митоген-стимулированной продукции ее клетками цитокинов ИЛ-1 β , ФНО α и ИЛ-10. Показатели нейроэндокринного статуса указанных реципиентов отличаются увеличением численности особей активного типа поведения с низкой эмоциональной реактивностью, которое регистрируется на фоне повышенного интрацеребрального уровня ИЛ-10, ФНО α и ИЛ-1 β в гипоталамусе и стриатуме, умеренно выраженными изменениями концентрации кортикостерона и тестостерона в структурах головного мозга и одновременным возрастанием кортикостерона в сыворотке крови.

Особенностями нейроиммуноэндокринного статуса половозрелых реципиентов после повторной трансплантации в ювенильном периоде ИКК доноров с пассивным поведением, являются низкий уровень развиваемой реакции ГЗТ, антителообразования в селезенке, пролиферативной активности спленоцитов и содержания ФНО α , ИФН γ , ИЛ-6 и ИЛ-10 в их культуральных супернатантах, при повышенном уровне активационного апоптоза CD4 $^{+}$ Т-клеток, а также увеличением численности особей с пассивным типом поведения на фоне повышенного уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ФНО α и ИФН γ и сниженного уровня BDNF в головном мозге; при этом характерны также разнонаправленные изменения в содержании нейроактивных стероидных гормонов кортикостерона и тестостерона в структурах головного мозга и в сыворотке крови на фоне выраженного снижения в сыворотке концентрации тестостерона.

Установлено, что наибольший эффект на формирование нейроиммуноэндокринного фенотипа к отдаленному периоду половозрелости отмечается после повторной трансплантации ИКК доноров с пассивным поведением и проявляется относительно реципиентов, которым в аналогичных условиях вводили спленоциты доноров с активным типом поведения, сниженными показателями иммунитета, повышенным содержанием в структурах головного мозга провоспалительных цитокинов и пониженным уровнем BDNF, дисбалансом кортикостерона и тестостерона в головном мозге и в сыворотке крови, а также доминированием пассивного типа поведения, что указывает на снижение в указанной группе реципиентов адаптационных возможностей организма с повышенным риском развития соматической, неврологической и психической патологии с нейроиммунным компонентом в патогенезе.

ВЫВОДЫ

1. Имунокомпетентные клетки в популяции спленоцитов животных с активным и пассивным типом поведения различаются по фенотипическим и функциональным свойствам: для клеток особей с активным поведением характерны более высокое содержание CD14-/115 $^{+}$ и низкое CD 3 $^{+}$ лимфоцитов с повышенной спонтанной и митоген- индуцированной пролиферативной активностью.
2. Половозрелые реципиенты после повторной трансплантации в ювенильном периоде спленоцитов от особей с активным поведением отличаются от животных контрольной группы без адоптивного переноса клеток, повышенными показателями реакции ГЗТ, увеличением спонтанной пролиферации и продукции ИФН γ в культурах спленоцитов, при сниженном антителообразовании в селезенке и митоген-стимулированной продукции спленоцитами ИЛ-1 β , ФНО α и ИЛ-10, что указывает на модулирующее влияние трансплантированных иммунокомпетентных клеток на формирование иммунного фенотипа реципиентов к отдаленному периоду половозрелости.
3. Сингенные реципиенты после повторных трансплантаций в ювенильном периоде спленоцитов от особей с пассивным поведением по сравнению с контрольными животными без адоптивного переноса клеток, характеризуются в половозрелом возрасте достоверно меньшими показателями ответа в реакции ГЗТ, антителообразования в селезенке, пролиферативной активности и продукции ряда цитокинов (ФНО α , ИФН γ , ИЛ-6 и ИЛ-10) в культурах спленоцитов при повышенном уровне активационного апоптоза CD4 $^{+}$ Т-клеток,

что свидетельствует о формировании иммунного статуса со сниженной функциональной активностью иммунной системы.

4. Повторный перенос в ювенильном периоде сингенных спленоцитов от особей с активным поведением проявляется в группе половозрелых реципиентов в сравнении с контрольной группой без адоптивного переноса клеток, увеличением численности особей активного типа поведения с низкой эмоциональной реактивностью на фоне повышенного интрацеребрального уровня ИЛ-10, ФНО α и ИЛ-1 β в гипоталамусе и стриатуме, умеренно выраженными изменениями концентрации кортикостерона и тестостерона в структурах головного мозга и одновременным возрастанием кортикостерона в сыворотке крови, что свидетельствует об отдалённых эффектах введения иммунокомпетентных клеток на формирование нейроэндокринного фенотипа реципиентов.

5. Реципиенты после адоптивного переноса в ювенильном периоде сингенных спленоцитов от особей с пассивным поведением отличаются от контрольной группы животных без адоптивного переноса клеток, увеличением численности особей с пассивным типом поведения на фоне повышенного уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО α и ИФН γ) и сниженного уровня BDNF в головном мозге; а также демонстрируют выраженные разнонаправленные изменения в содержании кортикостерона и тестостерона в структурах мозга и выраженное снижение уровня тестостерона в сыворотке крови, что свидетельствует о способности трансплантированных клеток оказывать отдаленный эффект на формирование нейроэндокринного фенотипа.

6. Иммунный и нейроэндокринный фенотипы половозрелых сингенных реципиентов после повторных трансплантаций в ювенильном периоде спленоцитов от особей с оппозиционными (активным и пассивным) типами поведения различны по показателям ответа в реакции ГЗТ, антителообразования в селезенке, уровня активационного апоптоза CD4 $^{+}$ Т-клеток, пролиферативной активности и продукции спленocyтaми в культурах цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО α , ИФН γ , ИЛ-6 и ИЛ-10), равно как и содержанием ИЛ-1 β и ИФН γ , уровнями BDNF и нейроактивных стероидных гормонов (кортикостерона и тестостерона) в структурах головного мозга, концентрацией тестостерона в сыворотке крови, а также доминирующим типом поведения, что свидетельствует о том, что различия в функциональном фенотипе иммунокомпетентных клеток, трансплантированных в ювенильном периоде, определяют особенности нейроиммуноэндокринного статуса у половозрелых реципиентов.

7. Нейроиммуноэндокринный статус сингенных половозрелых реципиентов после повторных трансплантаций в ювенильном периоде спленоцитов отличается от такового у животных без адоптивного переноса клеток более низкими значениями относительного количества АОК селезенки, митоген- индуцированной продукции спленocyтaми ФНО α и ИЛ-10, более высоким уровнем ФНО α в головном мозге, ИЛ-1 β в гипоталамусе, тестостерона во фронтальной коре и кортикостерона в сыворотке крови. Отличительные особенности нейроиммуноэндокринного статуса реципиентов определяются различной функциональной активностью введенных клеток, что свидетельствует о влиянии повторной трансплантации иммунокомпетентных клеток в ювенильном периоде на показатели функциональной активности основных гомеостатических систем организма иммунной, нервной и эндокринной в отдаленном периоде половозрелости.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) **Аникеева О.С.,** Абрамова Т.Я. Влияние иммунокомпетентных клеток на формирование поведенческой активности мышей (CBAx57BL/6)F1 /Сборник тезисов Всероссийской научно – практической конференции «Актуальные проблемы лабораторной диагностики и биотехнологии». – 2012. – С. 6-7.
- 2) **Аникеева О.С.,** Абрамова Т.Я. «Воздействие трансплантации иммунокомпетентных клеток на поведенческую активность и параметры иммунной системы мышей (CBAx57BL/6)F1» /Сборник тезисов третьей Российской конференции с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии». – 2013. – С.14-15.

- 3) **Аникеева О.С.**, Абрамова Т.Я. «Влияние трансплантации иммунокомпетентных клеток на нейроиммунные взаимодействия в эксперименте» //Нейроиммунология. – 2013. – Т.ХІ. – №1.
- 4) **Аникеева О.С.**, Абрамова Т.Я. «Влияние трансплантации иммунокомпетентных клеток на параметры иммунной и нервной систем мышей (СВАхС57BL/6)F1» //Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7(16). – №2-3. – С.164.
- 5) **Аникеева О.С.**, Абрамова Т.Я. Функциональные характеристики спленоцитов мышей (СВАхС57BL/6)F1, сформировавшиеся под влиянием иммунокомпетентных клеток сингенных взрослых животных с разным уровнем поведенческой активности //Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8(17). – №3. – С. 256-258.
- 6) **Аникеева О.С.**, Абрамова Т.Я., Козлов В.А. Формирование поведенческой активности мышей (СВАхС57BL/6)F1 в условиях многократного переноса иммунокомпетентных клеток от сингенных животных //Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – Т.14. – №1. – С.5-11.
- 7) Маркова Е.В., **Аникеева О.С.** Влияние иммунокомпетентных клеток на формирование поведенческого стереотипа в онтогенезе //В мире научных открытий. – 2015. – №2(62). – С.154-170.
- 8) **Аникеева О.С.**, Маркова Е.В. Влияния многократной трансплантации клеток иммунной системы на параметры поведения и интенсивность развития иммунных реакций у экспериментальных животных. //Интер-Медикал. – 2015. – №2(8). – С.4-7.
- 9) **Аникеева О.С.**, Абрамова Т.Я., Козлов В.А. Влияние иммунокомпетентных клеток на формирование поведенческой активности мышей (СВАхС57BL/6)F1 /Сборник тезисов Седьмой Всероссийской научно- практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов». – 2015. – С.14-15.
- 10) **Аникеева О.С.** Влияние многократной трансплантации иммунокомпетентных клеток на параметры поведения и функциональную активность иммунной системы у мышей (СВАхС57BL/6)F1 //Медицинская иммунология. – 2015. – Т.17. – №3s. – С. 9-10.
- 11) **Аникеева О.С.**, Абрамова Т.Я. Изучение закономерностей иммуномодуляции ориентировочно-исследовательского поведения мышей СВАхС57BL/6)F1 в процессе онтогенеза //Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18). – № 2 (1). – С.368 -370.
- 12) Markova E.V., **Anikeeva O.S.** Immune cells influence on the behavioral stereotypes formation in ontogenesis. //In the world of scientific discoveries, series B. – 2015. – №1(3) – P. 53-61.
- 13) **Аникеева О.С.**, Абрамова Т.Я. Влияние иммунокомпетентных клеток на параметры ориентировочно-исследовательского поведения и функциональную активность иммунной системы мышей (СВАхС57BL/6)F1 в ювенильный период //Нейроиммунология. – 2015. – Т. ХІІ. – №1-2. – С. 14-15.
- 14) Маркова Е.В., **Аникеева О.С.** Влияние трансплантации иммунокомпетентных клеток на формирование поведенческого стереотипа и иммунный статус реципиентов в онтогенезе //Нейроиммунология. – 2015. – Т. ХІІ. – №1-2. – С. 67-68.
- 15) **Аникеева О.С.**, Абрамова Т.Я., Пашкина Е.А., Маркова Е.В., Козлов В.А. Формирование уровня поведенческой активности и особенностей иммунной системы экспериментальных животных – мышей (СВАхС57BL/6)F1 в процессе онтогенеза /Фундаментальные и клинические аспекты иммунологии. Под редакцией: профессора, д-ра мед. наук С.В. Сенникова и академика РАН, профессора, д-ра мед. наук В.А. Козлова. – Новосибирск: Сибмедиздат НГМУ, 2016. – С. 94-95.
- 16) **Аникеева О.С.**, Абрамова Т.Я., Пашкина Е.А., Маркова Е.В., Козлов В.А. Иммунокомпетентные клетки и цитокины в формировании уровня поведенческой активности мышей (СВАхС57BL/6)F1 в процессе онтогенеза //Российский иммунологический журнал – 2016. – Т.10 (19). – № 2 (1). - С.93-95.
- 17) **Аникеева О.С.**, Абрамова Т.Я., Пашкина Е.А., Маркова Е.В., Козлов В.А. ИЛ-10 и ИНФγ у животных, выросших в условиях многократного переноса иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками //Нейроиммунология. – 2016. – Т. ХІІІ. – № 1-2. – С. 14-15.
- 18) **Аникеева О.С.**, Маркова Е.В. Влияния многократной трансплантации иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками на функциональную активность иммунной и нервной систем реципиентов //Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – № S. – С.11.

- 19) **Аникеева О.С.**, Маркова Е.В. Нейроиммунные показатели у реципиентов, подвергнутых многократной трансплантации иммунных клеток //Медицина Кыргызстана. – 2017. – Т. 1. – № 2. – С. 51-54.
- 20) **Аникеева О.С.**, Маркова Е.В., Пашкина Е.А., Козлов В.А. Содержание цитокинов в головном мозге и селезенке животных после многократной трансплантации иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками //Нейроиммунология. – 2017. – Т. XIV. – № 1-2. – С. 14-15.
- 21) **Аникеева О.С.**, Маркова Е.В., Блинова Е.А., Козлов В.А. Чувствительность Т-лимфоцитов к апоптозу у экспериментальных животных после многократной трансплантации клеток иммунной системы с определенными функциональными характеристиками //Нейроиммунология. – 2017. – Т. XIV. – № 1-2. – С.13-14.
- 22) Маркова Е.В., **Аникеева О.С.**, Савкин И.В., Козлов В.А. Нейроиммунный статус реципиентов, подвергшихся в ювенильный период развития многократной трансплантации иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками //Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2018. – №2(99). – С.15-20.
- 23) **Аникеева О.С.**, Маркова Е.В. Содержание цитокинов и нейростероидных гормонов у животных после многократной трансплантации иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками //Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т. 12(21). – №4. – С. 602-605.
- 24) Markova E.V., **Anikeeva O.S.** Recipient's behavioral stereotype after the multiple immune cells transplantation performed in the juvenile period of ontogenesis /Science today: from theory to practice. – 2018. – P.83-87.
- 25) Markova E.V., **Anikeeva O.S.**, Savkin I.V. Functional activity of the main adaptive systems after the multiple transplantation of immune cells with definite functional characteristics / Science today: from theory to practice. – 2018. – P. 92-97.
- 26) **Аникеева О.С.**, Маркова Е.В. Содержание цитокинов и нейроактивных стероидных гормонов у реципиентов после многократной трансплантации иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками //Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». – 2018. – Т. 20. – № 10. – С. 49 -53.
- 27) Маркова Е.В., Савкин И.В., **Аникеева О.С.**, Козлов В.А. Пролиферация и апоптоз лимфоцитов у экспериментальных животных после многократной трансплантации клеток иммунной системы, проведенной в ювенильный период развития // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т.18. – №2. – С. 119-126.