

На правах рукописи



Княжева Мария Александровна

Редактирование депрессивно-подобного фенотипа модулированными *ex vivo* кофеином иммунокомпетентными клетками

3.2.7 – Аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент **Маркова Евгения Валерьевна**

Официальные оппоненты:

Куликов Александр Викторович, доктор биологических наук, заведующий сектором генетических коллекций нейропатологий, главный научный сотрудник лаборатории нейрогеномики провоспалительных цитокинов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), (г. Новосибирск).

Иванова Светлана Александровна, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией молекулярной генетики и биохимии Научно-исследовательского института психического здоровья Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (НИИ психического здоровья Томского НИМЦ), (г. Томск).

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук» (г. Екатеринбург).

Защита состоится «___» _____ 2023 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.XX (24.1.184.01) в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <http://niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Облеухова И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Депрессия является серьезной медико-социальной проблемой в силу большой распространенности (от нее страдают более 300 миллионов человек во всем мире), вовлеченности лиц трудоспособного возраста и отсутствия высокоэффективной терапии [Zhou et al., 2021; WHO, 2021]. Социальные стрессорные факторы способствуют распространенности депрессии. Пандемия COVID-19 и связанные с ней правила социального дистанцирования [Chaturvedi, 2020], военные столкновения, ухудшение экономической ситуации, информационная война могут приводить к болезненной «ломке» социально-биологических механизмов адаптации и способствовать увеличению распространенности депрессивных расстройств, которые по прогнозам ВОЗ к 2030 году могут занять второе место в структуре причин нетрудоспособности [WHO, 2021]. Многочисленные факты указывают на важную роль нарушения взаимодействия основных гомеостатических систем в патогенезе депрессивных расстройств. Иммунная и нейроэндокринная системы играют важнейшую роль в поддержании динамического гомеостаза, как в нормальных физиологических условиях, так и при психической дезадаптации; психо- и иммунопатология тесно взаимосвязаны [Ader, 2007; Ветлугина и др., 2010, 2017]. Нарушение нейроиммунного взаимодействия в патогенезе депрессивных расстройств включает дисбаланс нейромедиаторных систем; снижение процессов нейропластичности, повышение эндогенных нейротоксинов, нейродегенеративные изменения, активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатической систем, модулирующих функциональную активность иммунной системы [Miller, Raison, 2016; Liu et al., 2020; Limanaqi, 2020; Stapelberg et al., 2022]. Иммунные нарушения при тревожно-депрессивных расстройствах у человека и при их моделировании у животных включают подавление иммунного ответа, угнетение Т-клеточных функций, активацию клеток врожденного иммунитета; при этом депрессия рассматривается как хронический низкоградиентный воспалительный процесс. В модели стресс-индуцированного депрессивно-подобного состояния показано, что хронический стресс оказывает провоспалительный эффект - усиливает мобилизацию моноцитов из костного мозга в циркуляцию и их миграцию в селезенку, легкие и головной мозг, индуцирует резистентность миелоидных клеток к глюкокортикои-

дам; усиливает экспрессию адгезивных молекул на эндотелиальных клетках, повышает уровень провоспалительных цитокинов в крови и головном мозге [Niraula et al., 2018; Kudryavtseva, 2021]. Основными цитокинами, вовлеченными в патогенез депрессии, по результатам мета - анализом являются ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ- 12, ФНО - α , ИНФ- γ [Köhler et al, 2017; Liu et al, 2020]. Показана также патогенетическая роль ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-17, ИЛ-18 [Leonard, Maes, 2012; Kappelmann et al, 2021]. Периферические цитокины, продуцируемые клетками иммунной системы, проникая через гематоэнцефалический барьер, оказывают модулирующее влияние на цитокиновую сеть мозга, а затем, посредством влияния на нейроэндокринные функции, нейротрансмиттерные системы и нейрональную активность вовлекаются в патофизиологические механизмы депрессии [Miller, Raison, 2016; Stapelberg et al., 2022]; при этом способность провоспалительных моноцитов мигрировать в периваскулярные пространства и ткань мозга и через интрацеребральную продукцию провоспалительных цитокинов активировать микроглию раскрывает иммунно-опосредованные механизмы влияния периферических иммунокомпетентных клеток (ИКК) на функции ЦНС, включая поведенческие реакции [Furlan et al, 2020; Kim et al, 2022].

Изменение цитокинового профиля на периферии и в ЦНС, равно как и модуляция активности нейромедиаторных систем головного мозга, опосредуют также иммуномодулирующие и поведенческие эффекты психоактивных веществ, используемых в терапии депрессивных расстройств [Köhler et al, 2017; Liu et al, 2020]. Классические антидепрессанты и анксиолитики, при всех положительных эффектах, недостаточно корректируют нарушения в когнитивной сфере при депрессивных расстройствах; остается большой процент пациентов с хроническими симптомами. Указанные вещества имеют также достаточно широкий спектр побочных эффектов в результате недифференцированного воздействия на органы и ткани организма; при этом они, в большинстве своем, быстро выводятся, что обуславливает необходимость их многократного введения для поддержания терапевтического эффекта; это приводит к формированию привыкания и ограничивает возможности их применения. Кроме того, лекарственный патоморфоз ряда психических заболеваний, включая депрессивные расстройства, приводит к увеличению числа пациентов, резистентных к общепринятым психофар-

макологическим средствам: примерно треть всех пациентов не реагируют на терапию. Это делает поиск новых методов лечения указанной патологии актуальной задачей современной медицинской науки. Одним из путей решения проблемы является разработка новых методов лечения, основанных на иммунологических подходах. Терапия депрессивных расстройств, применяемая в настоящее время, не обеспечивает полного излечения, вероятно, в связи с формированием "порочного круга", разорвать который возможно путем нормализации нейроиммунной регуляторной взаимосвязи. Выраженное фенотипическое и функциональное сходство клеток ЦНС и иммунной системы, одностороннее влияние на них большинства психоактивных веществ подтверждает межсистемную взаиморегуляцию и позволяет рассматривать ИКК в качестве модельных объектов для воздействия на межсистемную функциональную взаимосвязь. В лаборатории нейроиммунологии НИИФКИ впервые была установлена возможность и определены основные механизмы направленного изменения паттернов поведения трансплантацией ИКК с определенной функциональной активностью [Markova, 1999-2016; Маркова, 2006-2023]. Способность лимфоцитов после адоптивного переноса модулировать поведение и когнитивные функции, в том числе и путем непосредственного контакта с клетками ЦНС, в последние годы показана также и другими исследователями [Song, 2016; Clark, 2016, 2018], что предполагает возможность коррекции депрессивных расстройств с использованием ИКК с направленно измененной *ex vivo* психоактивным веществом функциональной активностью. Выраженные иммуномодулирующие свойства кофеина, в том числе, рецептор-опосредованная модуляция функциональной активности ИКК различных типов, включая спленциты [Anzari et al., 2017; Açıkalın, 2021], теоретически обосновывает возможность использования этого вещества для модуляции *in vitro* нарушенной при депрессивно-подобном состоянии функциональной активности ИКК с последующим использованием этих клеток для редактирования депрессивно-подобного фенотипа. Исследования в этой области позволяют расширить представления о патогенетических механизмах депрессивных расстройств, равно как и обосновать новые подходы к их терапии.

Цель исследования: изучение влияния трансплантации иммунокомпетентных клеток, модулированных *ex vivo* кофеином, на

функциональную активность иммунной и нервной систем, поведенческий фенотип у депрессивно-подобных сингенных реципиентов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Оценить в условиях *in vitro* влияние кофеина на функциональные свойства спленоцитов мышей в депрессивно-подобном состоянии.
2. Охарактеризовать поведенческий фенотип депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином сингенных спленоцитов.
3. У депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином сингенных спленоцитов исследовать показатели функциональной активности иммунной системы (иммунный ответ *in vivo*; пролиферативную активность, продукцию цитокинов спленоцитами и уровень триптофана в этих клетках *in vitro*).
4. Изучить структурно-функциональные показатели нервной системы (морфологическую картину ядер гиппокампа, содержание цитокинов и нейротрофического фактора BDNF в патогенетически значимых для состояния депрессивности структурах головного мозга) сингенных депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином спленоцитов.

Научная новизна

Впервые показано, что ИКК депрессивно-подобных самцов (CBAxС57BL/6)F1, обработанные *in vitro* кофеином, изменяют свои функциональные свойства и после внутривенного введения сингенным депрессивно-подобным реципиентам оказывают выраженное позитивное иммунно- и психонейромодулирующее влияние, воздействуя на основные патогенетические механизмы депрессии.

Впервые установлено, что модулированные *ex vivo* кофеином спленоциты депрессивно-подобных доноров (CBAxС57BL/6)F1 вызывают у депрессивно-подобных сингенных реципиентов иммуностимулирующий эффект, проявляющийся в усилении антителобразования в селезенке при системном иммунном ответе и повышении пролиферативной активности спленоцитов.

Впервые показано, что трансплантация прекультивированных с кофеином спленоцитов депрессивно-подобных самцов

(CBAxС57BL/6)F1 вызывает у депрессивно-подобных сингенных реципиентов снижение катаболизма триптофана в селезенке на фоне снижения продукции спленоцитами провоспалительных (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α , ИНФ- γ) и повышения противовоспалительных (ИЛ-10 и ИЛ-4) цитокинов.

Впервые выявлено снижение уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИНФ- γ в гипоталамусе, ИНФ- γ в префронтальной коре, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИНФ- γ и ФНО- α в гиппокампе при повышении уровня противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10 в гиппокампе и ИЛ-10 в стриатуме, указывающих на снижение нейровоспаления у депрессивно-подобных реципиентов (CBAxС57BL/6)F1 после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином сингенных спленоцитов.

Впервые выявлено повышение нейрональной площади в CA1 и CA3 полях гиппокампа и уровня BDNF в гиппокампе и префронтальной коре после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином спленоцитов, свидетельствующее о стимуляции процессов нейропластичности в патогенетически значимых для состояния депрессивности структурах головного мозга.

Впервые установлена возможность редактирования депрессивно-подобного поведения трансплантацией модулированных *ex vivo* кофеином спленоцитов, что проявляется у сингенных депрессивно-подобных реципиентов в снижении ангедонии, выраженном увеличении временных периодов мобильности при снижении периодов пассивного плавания с исчезновением периодов полной неподвижности в воде в тесте Порсолта, выраженной стимуляции моторного и исследовательского компонентов ориентировочно-исследовательского поведения.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о роли ИКК в патогенетических механизмах состояния депрессивности. Результаты исследования выявили возможность модулирования функциональной активности иммунной системы (повышение интенсивности гуморального иммунного ответа, пролиферативной активности клеток селезенки, снижение в спленоцитах катаболизма триптофана и изменение продукции имидра цитокинов, являющихся биомаркерами антидепрессантной терапии) трансплантацией ИКК с измененной *ex vivo* кофеином функциональной активностью. Показана также возможность модулиро-

ванных кофеином ИКК корректировать депрессивно-подобное поведение на фоне снижения нейровоспаления и стимуляции процессов нейропластичности в патогенетически значимых для состояния депрессивности структурах головного мозга.

Проблема поиска новых эффективных методов лечения депрессии, преодоления полной или частичной фармакорезистентности, а также снижения побочного действия применяемых лекарственных препаратов до сих пор остается открытой и очень актуальной, учитывая большое количество пациентов с депрессивными расстройствами во всем мире. Полученные результаты могут служить экспериментальным обоснованием разработки новых технологий иммунотерапии депрессивных расстройств аутологичными ИКК с модулированной *ex vivo* кофеином функциональной активностью, что и определяет практическую значимость диссертационного исследования. 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. Введение модулированных *ex vivo* кофеином иммунокомпетентных клеток является фактором, обуславливающим выраженный иммуностимулирующий эффект на фоне подавления провоспалительной активности при депрессивно-подобном состоянии.
2. Снижение нейровоспаления при введении модулированных *ex vivo* кофеином иммунокомпетентных клеток при депрессивно-подобном состоянии является фактором, обуславливающим стимуляцию процессов нейропластичности (усиление нейрогенеза в гиппокампе и повышение уровня BDNF в гиппокампе и префронтальной коре) и редактирование депрессивно- подобного поведения.

Степень достоверности результатов

Полученные результаты имеют высокий уровень статистической значимости. Научные положения и выводы обоснованы и получены с использованием современных методических приемов и высокоинформативных методов исследования, проведенных *in vivo* и *in vitro*, достаточной выборкой исследуемых экспериментальных животных в соответствии с основными принципами работы с лабо-

раторными живыми объектами и большим объемом материала, который подвергнут адекватному статистическому анализу.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих научных мероприятиях: II Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов "Современная российская наука глазами молодых исследователей" (Красноярск, 2012); III всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии» (Томск, 2013); отчетные конференции аспирантов и ординаторов НИИФКИ (Новосибирск, 2014-2016); 10th International Conference on Psychiatry "Psychiatric Models; Biological and Psychological perspectives (Kingdom of Saudi Arabia, Jeddah, 2014); V International Interdisciplinary Academic Conference "Innovation and Humans" (Turkey, Antalia, 2014); 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); XVI Всероссийский научный форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2017); WPA Thematic Congress "Innovation in Psychiatry: Effective Interventions for Health and Society" (Melbourne, Australia, 2018); IX - XI International academic conferences "Human safety in extreme climate environmental and social conditions" (Turkey, Kemer, 2018-2021); 26th Congress of EPA (Nice, France, 2018); IV российская конференция с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии» (Томск, 2018); 27th European Congress of Psychiatry (Warsaw, Poland, 2019); VII Международный симпозиум «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (Санкт-Петербург, 2019); 28th European Congress of Psychiatry (Madrid, Spain, 2020); Российская конференция с международным участием «Актуальные проблемы нейробиологии психических и аддиктивных расстройств» (Томск, 2020); 29th Virtual European Congress of Psychiatry (Florence, Italy 2021); Юби-

лейная конференция НИИФКИ, посвященная 40-летию со дня образования (Новосибирск, 2021); 13th International Multiconference on “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology” – BGRS/SB-2022 (Новосибирск, 2022); 30th European Congress of Psychiatry (EPA Virtual, 2022, Budapest, Hungary, 2022); IX российская конференция с международным участием «Нейроиммунопатология», посвященная 100-летию со дня рождения академика РАМН Г.Н. Крыжановского (Москва 2022).

Личный вклад автора

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 40 печатных работ, в том числе 23 статьи (из них 14 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук), 7 публикаций (из них 2 статьи) в журналах международных баз данных Web of Science и Scopus, 1 патент на изобретение.

Структура и объем диссертации

Материал диссертации изложен на 200 страницах машинописного текста, иллюстрирован 30 рисунками и 7 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Библиографический указатель содержит 371 цитируемый источник (в том числе 69 работ отечественных авторов).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Экспериментальные животные. Исследование выполнено на мышах-самцах (СВАхС57BL/6) F1 в возрасте 3-4 - х месяцев, полученных 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. Все манипуляции выполняли в световой фазе цикла дня. Исследования с животными проводились в соответствии с законодательством Российской Федерации, положе-

ниями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, требованиями и рекомендациями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных и были одобрены на заседании локально-этического комитета НИИФКИ (протокол заседания № 139 от 30.05.2022 г.).

Вещество. Кофеин-бензоат натрия (раствор для инъекций) 100 мг/мл амп. 1 мл №10. Производитель: ОЗ ГНЦЛС (Украина, Харьков), активное вещество: 1 мл содержит кофеин - бензоата натрия 100 мг. Вспомогательные вещества: гидроксид натрия, вода для инъекций. Лекарственная форма - инъекционный раствор. Приготовление раствора для обработки клеток осуществлялось путем последовательного разведения физиологическим раствором до концентрации 100 мкг/1 мл. В дальнейшем, в тексте будет употребляться название вещества «кофеин», подразумевая кофеин-бензоат натрия.

Моделирование депрессивно-подобного состояния. Депрессивно-подобное состояние формировалось у особей с пассивным типом поведения, наименее устойчивых к стрессовым воздействиям [Немец, 2017; Маркова, 2021], в результате 20-кратного опыта поражений в ежедневных агонистических взаимодействиях с активным партнером (модель хронического социального конфликта) [Kudryavtseva 1998, 2014]. Самцы (СВА×С57В1/6)F1 в депрессивно-подобном состоянии использовались в последующих экспериментах в качестве доноров и реципиентов ИКК.

Получение суспензии спленоцитов. Депрессивно-подобных самцов (СВА×С57В1/6)F1 забивали путем цервикальной дислокации; в стерильных условиях вскрывали брюшную полость, извлекали селезенку, очищали от соединительной ткани и помещали во флаконы с охлажденной до 40 С средой RPMI-1640 (5 мл на селезенку). Образовавшуюся в результате измельчения суспензию клеток 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. Определение жизнеспособности клеток проводили с помощью трипанового синего [Шахов и др., 2004].

Подготовка и трансплантация спленоцитов. Спленоциты депрессивно-подобных мышей - доноров (СВА x C57 BL/6)F1 обра-

батывали *in vitro* кофеином из расчета 15×10^6 клеток/100 мкг/кофеина в присутствии 3% FCS (Nucclone) в течение 25 минут с последующим 3-кратным отмыванием клеток от кофеина. Трансплантация прекультивированных с кофеином спленоцитов сингенным депрессивно-подобным реципиентам производилась в ретро-орбитальный синус в концентрации 15×10^6 клеток в объеме 0,3 мл физиологического раствора на одно животное. В контрольной группе реципиентов подготовка и трансплантация спленоцитов проводилась в аналогичных условиях эксперимента, за исключением того, что прекультивирование клеток производилось без кофеина.

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 ядросодержащих клеток селезенки. Подсчет ядросодержащих клеток селезенки производили в камере Горяева.

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 $ИР = (P_0 - P_k) / P_k$ и выражали в процентах [Yoshikai, 1979].

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-глутамина, 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 (Кона) (Pharmacia Fine Chemicals, Sweeden) 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 Н³-тимидин (1 мкКю 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 (Intertechnic, Франция). Результаты представлены в виде среднего счета в имп/мин.

Определение количественного содержания цитокинов. Количественное содержание цитокинов определяли в образцах культуральных супернатантов спленоцитов и в лизатах отдельных структур головного мозга депрессивно-подобных реципиентов. 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 структур головного мозга (префронтальная кора, гипоталамус, гиппокамп, стриатум) 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” (BenderMed Systems, Austria) для определения ИФН- γ , ИЛ-6 и «R&D Systems Inc.» (USA) для определения ИЛ-1 β , 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.

Определение уровня триптофана в клетках селезенки. Уровень триптофана определяли методом лазерно-индуцированной флюоресценции [Tedetti, et al., 1965; Бурштейн, 1973] в суспензии спленоцитов депрессивно-подобных реципиентов. Исследования были проведены на базе Института теоретической и прикладной механики им. С. А. Христиановича СО РАН.

Определение количественного содержания нейротрофического фактора в головном мозге. У депрессивно-подобных реципиентов количественное содержание нейротрофического фактора BDNF определяли в лизатах структур головного мозга, для которых показана наиболее выраженная экспрессия указанного фактора (гиппокамп, префронтальная кора) методом ИФА с использованием специфической тест – системы «R&D Systems Inc.» (USA) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Гистологическое исследование гиппокампа. Депрессивно-подобных реципиентов через 48 часов после трансплантации прекультивированных с кофеином спленоцитов усыпляли в камере с CO₂; транскардиально перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS), а затем 4% параформальдегидом в PBS. Головной мозг быстро извлекали, обезживали с 40% раствором сахарозы в 1 x PBS с 4 % параформальдегидом, замораживали в среде О.С.Т и хранили при температуре -70 С. Криосрезы гиппокампа толщиной 30 мкм были получены при помощи криотома HistoSafeMicroCut – SADV (Китай). Окрашивание по Нисслю проводили по стандартной процедуре (Paxinos and Franklin, 2019). Изображение было получено и проанализировано с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ci (Nikon, Япония), соединенного с камерой Nikon DS-Fi2 (Nikon, Япония) и программным обеспечением Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics,

СА, США). Плотность нейронов измеряли полуколичественным методом (Tikhonova et al., 2017).

Тестирование поведения животных. Тестирования проводились в интервале с 10 до 15 часов. Поведение депрессивно-подобных реципиентов исследовали в последовательном режиме: один тест в день.

Тест «Открытое поле». Использовался для определения уровня ориентировочно-исследовательского поведения (ОИП) [Буреш, 1991]. Стандартная установка представляла собой камеру размером 100x100 см, с высокими бортами (40 см). Пол установки расчерчен на равные сектора (10x10см). Освещение осуществлялось с помощью бестеневой лампы мощностью 100 Вт, расположенной над центром поля на высоте 100 см. Животное помещалось в угол камеры, и регистрировалась его моторная активность (количество пересеченных центральных и периферических квадратов), исследовательская активность (количество вертикальных стоек) и эмоциональность (количество актов дефекации) в течение 5 минут

Тест «Принудительное плавание». Поведение депрессивно-подобных реципиентов в тесте по Порсолту [Porsolt, Bertin, 1977] исследовалось с использованием современного аппаратно-программного комплекса EthoVision XT (Noldus Information Technology, Нидерланды). Оценивались временные периоды активного плавания (мобильности) и пассивного плавания (дрейф + полная неподвижность в воде).

Тест «Потребление раствора сахарозы» (тест на ангедонию). Индивидуальное потребление (слизывание) 1% раствора сахарозы и воды в условиях свободного выбора регистрировалось методом автоматизированного круглосуточного мониторинга с помощью мультифункциональной системы, поведенческого фенотипирования лабораторных животных IntelliCage (TSE systems, Germany).

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 проведении сравнений независимых выборок, при числе групп = 2 в случае нормального распределения и равных дисперсий в группах применяли t-критерий Стьюдента для независимых наблюдений; при отклонении распределения от нормального применяли критерий Манна-Уитни. Различия частот в независимых группах анали-

зировались с помощью точного критерия Фишера. 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

В качестве доноров и реципиентов ИКК использовались самцы (СВА х С57Bl/6)F1 в депрессивно-подобном состоянии. Прекультивированные с кофеином спленоциты депрессивно-подобных доноров внутривенно вводили сингенным депрессивно-подобным реципиентам; через 24-48 часов после введения клеток оценивались паттерны поведения, параметры функциональной активности иммунной системы (иммунный ответ *in vivo*; пролиферативная активность, продукция цитокинов спленоцитами и уровень триптофана в этих клетках *in vitro*) и структурно-функциональные показатели нервной системы (морфологическая картина ядер гиппокампа, содержание цитокинов и нейротрофического фактора BDNF в патогенетически значимых для состояния депрессивности структурах головного мозга).

Сформированность состояния депрессивности у самцов (СВА х С57Bl/6)F1 с пассивным типом поведения вследствие 20-кратного опыта поражений в ежедневных агонистических взаимодействиях с активным партнером была подтверждена: а) характерными паттернами депрессивно-подобного поведения (выраженная ангедония, значительное снижение мобильности при увеличении периодов полной неподвижности в воде в тесте Порсолта, снижение исследовательского и преимущественно моторного компонентов ОИП при повышении эмоциональной реактивности; б) сниженным антителообразованием в селезенке при системном иммунном ответе, сниженной пролиферативной активностью спленоцитов и изменением спонтанной и стимулированной продукции этими клетками цитокинов, преимущественно в сторону повышения провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИНФ- γ , ФНО- α ; в) уменьшенной нейрональной площадью в СА1 и СА3 зонах гиппокампа, повышенным содержанием ряда провоспалительных цитокинов в патогенетически значимых для состояния депрессивности структурах мозга, свидетельствующем о развитии нейровоспаления. В качестве

группы сравнения использовали мышей аналогичного возраста с пассивным типом поведения.

Характеристика трансплантируемых клеток

При моделировании депрессивно-подобного фенотипа авторами методики именно в селезенке были отмечены выраженные как иммуносупрессивные, так и, возможно, компенсаторные реакции [Кудрявцева и др., 2017], что и обусловило выбор спленоцитов в качестве трансплантируемых клеток. Прекультивирование с кофеином модулировало функциональную активность указанных клеток, что проявилось в стимуляции их пролиферативной активности (спонтанной и Кон-А индуцированной), снижении спонтанной продукции ИЛ-1 β ($p < 0,05$), ИНФ- γ ($p < 0,01$) и ФНО- α при повышении продукции ИЛ-2 ($p < 0,05$) и ИЛ-10 ($p < 0,05$), а также снижении митоген-стимулированной продукции ИЛ-1 β ($p < 0,01$), ИНФ- γ ($p < 0,01$) при повышении продукции ИЛ-10 ($p < 0,05$). Следовательно, кофеин в условиях *in vitro* модулирует функциональную активность спленоцитов депрессивно-подобных самцов (CBA x C57BL/6)F1, что выражается в изменении пролиферативной активности клеток и продукции ими ряда цитокинов.

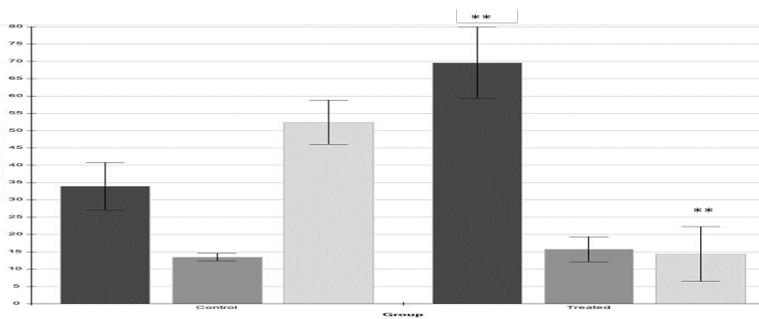
Влияние трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином иммунокомпетентных клеток на поведение, показатели функциональной активности иммунной и нервной систем у сингенных депрессивно-подобных реципиентов

Поведенческий фенотип депрессивно-подобных реципиентов

У депрессивно-подобных реципиентов (CBA x C57BL/6)F1 через 24 часа после трансплантации сингенных спленоцитов, прекультивированных с кофеином, наблюдалось предпочтение потребления 1 % раствора сахарозы ($87,8 \pm 2,0$ и $27,5 \pm 11,8$ в процентном отношении от общего количества потребляемой жидкости по сравнению с контрольной группой реципиентов соответственно; $p < 0,01$). Различия по данному показателю между указанными группами реципиентов регистрировались в течение 9-ти дней тестирования, что свидетельствует о снижении ангедонии, главного признака состояния депрессивности у грызунов [Hasler et al., 2016].

Анализ поведения в тесте «Принудительное плавание» выявил у депрессивно-подобных реципиентов (CBA x C57BL/6)F1 после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином спленоци-

тов выраженное увеличение времени активного плавания (мобильности), за счет повышения временных периодов высокой мобильности, при резком снижении периодов пассивного плавания с исчезновением периодов полной неподвижности в воде (Рис. 1).



Примечание: тестирование проводилось через 24 часа после клеточной трансплантации; время тестирования -5 минут (EthoVision XT, Noldus Information Technology, The Netherlands). По оси ординат – совокупная продолжительность периода в составе общей мобильности (%). 1 – высокая мобильности, 2 – умеренная мобильности, 3 – пассивное плавание (дрейф + полная неподвижность). Контрольная группа (control) реципиентов - трансплантация спленоцитов, прекультивированных без кофеина; опытная группа (treated) реципиентов - трансплантация спленоцитов, прекультивированных с кофеином. Данные представлены в виде $M \pm SE$; $n = 10$ в каждой группе; ** - $p < 0,01$ по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе реципиентов.

Рисунок 1 - Поведение депрессивно-подобных реципиентов (CBA×C57BL/6)F1 в тесте «Принудительное плавание» после трансплантации сингенных спленоцитов, модулированных *ex vivo* кофеином.

Анализ поведения в тесте «Открытое поле» депрессивно-подобных реципиентов (CBA×C57BL/6)F1 после трансплантации сингенных спленоцитов, прекультивированных с кофеином, выявил выраженное повышение показателей горизонтальной двигательной активности, отражающие моторный компонент ОИП, равно как и показателей вертикальной двигательной активности с появлением свободных стоек, отражающей исследовательский компонент поведения (таблица 1).

Таблица 1 - Параметры ориентировочно-исследовательского поведения депрессивно-подобных реципиентов (CBA×C57BL/6)F1 после трансплантации сингенных спленоцитов, модулированных *ex vivo* кофеином.

Показатель	контрольная группа (n = 61)	опытная группа (n=68)
Горизонтальная двигательная активность		
Периферическая	3,2±2,8	103,0±46,9**
Центральная	0	0,7±0,3**
Суммарная	3,2±2,8	103,7±49,9**
Вертикальная двигательная активность		
Пристеночные стойки	0,2±0,2	2,5±1,4**
Свободные стойки	0	0,4±0,3**
Суммарная	0,2±0,2	2,9±1,7**

Примечание: контрольная группа - депрессивно-подобные реципиенты (трансплантация спленоцитов, прекультивированных без кофеина); опытная группа - депрессивно-подобные реципиенты (трансплантация спленоцитов, прекультивированных с кофеином). Результаты представлены в виде ($M \pm SD$); ** - $p < 0,01$ относительно соответствующего показателя в контрольной группе.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о редактировании депрессивно-подобного поведения реципиентов после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином сингенных спленоцитов, что проявилось в снижении ангедонии, стимуляции ОИП и активности в тесте «Принудительное плавание».

Показатели функциональной активности иммунной системы реципиентов

Интенсивность гуморального и клеточного иммунного ответа

У депрессивно-подобных реципиентов (СВА х 57BL/6)F1 после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином сингенных спленоцитов регистрировалось увеличение как относительного, так и абсолютного числа АОК селезенки, свидетельствующих о стимуляции гуморального иммунного ответа; при этом каких-либо существенных изменений высоты развиваемой реакции ГЗТ не наблюдалось (Таблица 2).

Таблица 2 - Интенсивность гуморального и клеточного иммунного ответа депрессивно-подобных реципиентов (СВА×С57BL/6)F1 после трансплантации сингенных спленоцитов, модулированных *ex vivo* кофеином.

Параметры	Группы реципиентов	
	Контрольная	Опытная
Относительное число АОК (АОК/10 ⁶)	332,2 ± 74,7	553,6 ± 57,1*

Абсолютное число АОК	69515,4 ± 7678,6	87821,2 ± 6118,6*
Уровень реакции ГЗТ (ИР %)	10,2 ± 2,3	12,1 ± 1,4

Примечание: контрольная группа депрессивно-подобных реципиентов (трансплантация спленоцитов, прекультивированных без кофеина); опытная группа депрессивно-подобных реципиентов (трансплантация спленоцитов, прекультивированных с кофеином). Результаты представлены в виде $M \pm SD$; $n = 15$ в каждой группе; * - $p < 0,01$ по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе.

Пролиферативная активность спленоцитов

У депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином сингенных спленоцитов показана стимуляция спонтанной пролиферативной активности лимфоцитов в культуре клеток селезенки (Рисунок 2).

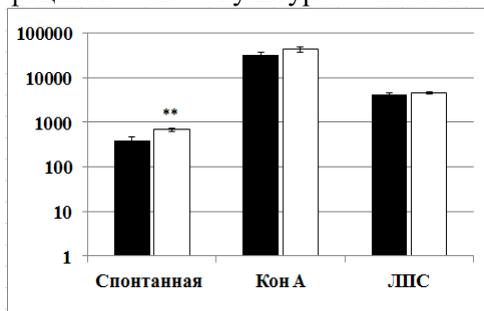


Рисунок 2 - Пролиферативная активность (имп/мин) спленоцитов депрессивно-подобных реципиентов (СВА×С57ВL/6)F1 после трансплантации сингенных спленоцитов, модулированных *ex vivo* кофеином.

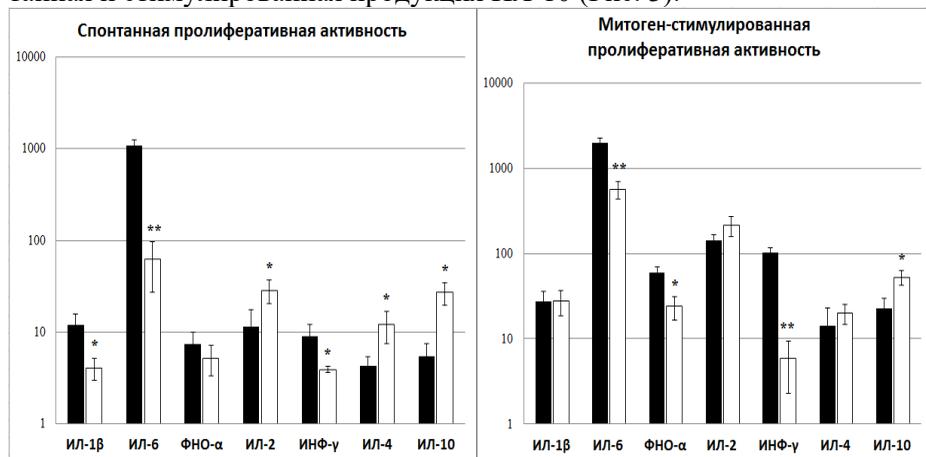
Примечание: темные столбики - спленоциты депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации клеток, прекультивированных без кофеина (контрольная группа клеток). Светлые столбики - спленоциты депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации клеток, прекультивированных с кофеином (опытная группа клеток). ** - $p < 0,01$ по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе клеток.

Следовательно, после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином спленоцитов у сингенных депрессивно-подобных реципиентов (СВАхС57ВL/6)F1 установлено усиление антителообразования в селезенке при системном иммунном ответе и повышение пролиферативной активности спленоцитов, что свидетельствует об иммуностимулирующем эффекте введенных клеток.

Продукция цитокинов спленоцитами

У депрессивно-подобных реципиентов (СВА х С57ВL/6)F1 после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином спленоцитов показано снижение спонтанной продукции клетками селезенки провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИНФ- γ и митоген-стимулированной продукции ИЛ-6, ИНФ- γ и ФНО- α . При этом по-

вышалась спонтанная продукция спленоцитами ИЛ-2, ИЛ-4, спонтанная и стимулированная продукция ИЛ-10 (Рис. 3).

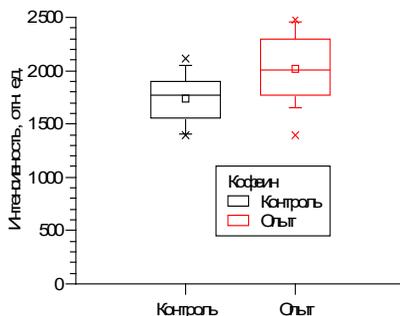


Примечание: Темные столбики – контрольная группа клеток сингенных депрессивно-подобных реципиентов (трансплантация прекультивированных без кофеина клеток). Светлые столбики – опытная группа клеток сингенных депрессивно-подобных реципиентов (трансплантация прекультивированные с кофеином клеток); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе клеток.

Рисунок 3 - Продукция цитокинов (пг/мл) спленоцитами сингенных депрессивно-подобных (СВА x C57BL/6)F1 реципиентов, после трансплантации сингенных спленоцитов, модулированных *ex vivo* кофеином.

Уровень триптофана в спленоцитах

Метаболиты триптофана играют важную роль в патогенезе депрессии. Результаты однофакторного дисперсионного анализа максимальных интенсивностей флуоресценции исследуемых образцов выявили более высокий уровень триптофана в клетках селезенки депрессивно-подобных реципиентов (СВА x C57BL/6)F1, которым были введены спленоциты, модулированные *ex vivo* кофеином, по сравнению с таковым в спленоцитах контрольной группы реципиентов ($F = 12,39$, $p = 0,001$ для средних значений образцов клеток контрольной и опытной групп), что свидетельствует о снижении катаболизма триптофана в спленоцитах опытной группы реципиентов (Рис. 4).



Примечание: Уровень триптофана оценивался методом лазерно-индуцированной флуоресценции; контроль - суспензия спленоцитов депрессивно-подобных реципиентов, которым была произведена трансплантация спленоцитов, прекультивированных без кофеина (n = 20); опыт - суспензия спленоцитов депрессивно-подобных реципиентов, которым была произведена трансплантация спленоцитов, прекультивированных с кофеином (n = 25).

Рисунок 4 - Коробочная диаграмма максимума интенсивности флуоресценции суспензии клеток селезенки депрессивно-подобных реципиентов (CBA x C57BL/6)F1 после трансплантации сингенных спленоцитов, модулированных *ex vivo* кофеином.

В селезенке, как и в центральных нейронах, идет распад триптофана по кинурениновому пути с участием фермента индоламин 2,3-диоксигеназы (ИДО), экспрессия которого индуцируется провоспалительными цитокинами (преимущественно ИНФ- γ) и ингибируется противовоспалительным ИЛ-4. В исследовании показано снижение продукции спленоцитами ИНФ- γ и повышение ИЛ-4 в спленоцитах депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином ИКК (Рис.3), позволяющее предположить, что продемонстрированное снижение катаболизма триптофана в спленоцитах может быть следствием цитокин-опосредованного снижения экспрессии ИДО.

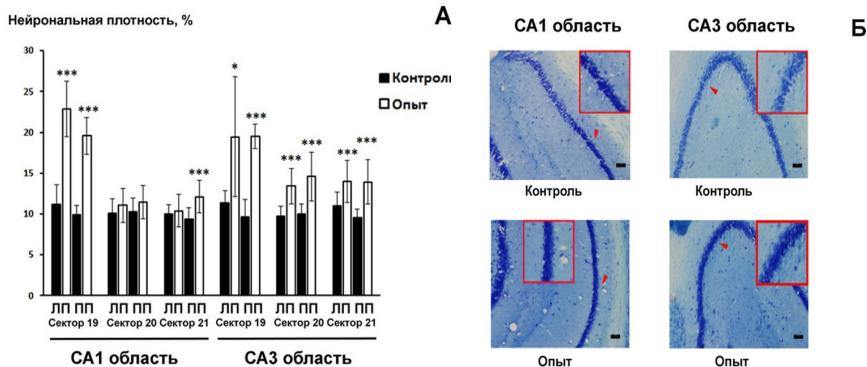
Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о том, что в условиях *in vitro* кофеин модулирует функциональную активность спленоцитов депрессивно-подобных самцов (CBA x C57BL/6)F1, вызывая стимуляцию спонтанной и Кона-индуцированной пролиферативной активности указанных клеток, изменение продукции ими ряда цитокинов. Трансплантация прекультивированных с кофеином ИКК сопровождается у сингенных депрессивно-подобных реципиентов стимуляцией антителообразования и спонтанной пролиферативной активности клеток селезенки, модуляцией продукции спленоцитами цитокинов в сторону снижения провоспалительных и повышения противовоспалительных цитокинов и снижением в этих клетках катаболизма триптофана.

Структурно-функциональные показатели нервной системы депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином сингенных спленоцитов

Морфологическая характеристика ядер гиппокампа

При депрессивных расстройствах, вызванных хроническим стрессом, регистрируется существенное уменьшение объема гиппокампа [Roohi et al., 2021], обусловленное снижением плотности пирамидных нейронов CA1 и CA3 полей [Doolin et al., 2018], что показано и в использованной модели. Известно, что нейродегенеративные изменения при депрессивных расстройствах являются частично обратимыми под влиянием успешной терапии, эффективность которой зависит от степени восстановления гиппокампального нейрогенеза [Magaraggia et al., 2021].

В результате проведенных исследований получены приоритетные данные, свидетельствующие о том, что после трансплантации прекультивированных с кофеином сингенных спленоцитов у самцов в депрессивно-подобном состоянии, индуцированном хроническим социальным стрессом, существенно увеличивается плотность пирамидных нейронов в полях CA1, CA3 гиппокампа (Рис. 5), что свидетельствует о стимуляции нейрогенеза в указанных зонах.



Примечание: цифровое обозначение секторов полей CA1, CA3 гиппокампа соответствует уровням срезов относительно брегмы, согласно гистологическому атласу мозга мыши (Paxinos., Franklin, 2013).

А: Темные столбики - контрольная группа депрессивно-подобных реципиентов (трансплантация спленоцитов, прекультивированных без кофеина). Светлые столбики - опытная группа депрессивно-подобных реципиентов (трансплантация спленоцитов, прекультивированных с кофеином); n=10-18 в каждой группе; * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$ по сравнению с соответствующим показателем в контрольном образце.

Б: микрофотографии коронарных срезов гиппокампа, окрашенные по Нисслю. Увеличение - 100×, шкала – 50 мкм.

Рисунок 5 - Плотность пирамидных нейронов (%) полей CA1, CA3 гиппокампа в правом и левом полушариях головного мозга депрессивно - подобных реципиентов (СВАхС57BL/6) F1 после трансплантации сингенных спленоцитов, модулированных *ex vivo* кофеином.

Уровень BDNF и цитокинов в отдельных структурах головного мозга

Нейротрофические факторы играют значительную роль в развитии, дифференцировке, синаптогенезе и выживании нейронов головного мозга, а также в процессах их адаптации к внешним воздействиям. BDNF (как транскрипты мРНК, так и белок) наиболее широко представлен в головном мозге. Считается, что нарушения генетической и эпигенетической регуляции метаболизма, транспорта или передачи сигнала BDNF способствуют развитию депрессивных расстройств; BDNF является биомаркером-кандидатом ответа на терапию антидепрессантами [Tang, et al., 2016; Wenbo, et al, 2020]. Показано, что продемонстрированная выше стимуляция гиппокампального нейрогенеза после трансплантации модулированных *in vitro* кофеином спленоцитов у сингенных депрессивно-подобных реципиентов регистрировалась на фоне повышения уровня BDNF в гиппокампе и префронтальной коре (Табл.3).

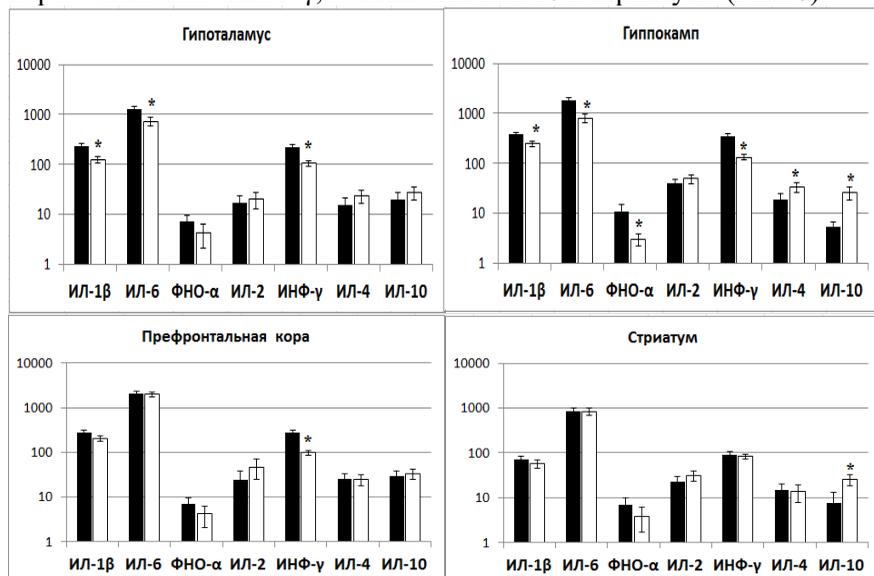
Таблица 3 - Содержание BDNF (пг/мг ткани) в структурах головного мозга депрессивно-подобных реципиентов (СВА х С57Bl/6)F1 после трансплантации сингенных спленоцитов, модулированных *ex vivo* кофеином.

Структура мозга	Контроль	Опыт
Префронтальная кора	121,2± 72,3	267, 5± 65,8*
Гиппокамп	347,5 ± 97,8	587,9 ± 96,7*

Примечание: контроль - образцы лизатов соответствующей структуры головного мозга депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации прекультивированных без кофеина спленоцитов. Опыт - образцы лизатов соответствующей структуры головного мозга депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации прекультивированных с кофеином спленоцитов; n=10 в каждой группе; * - $p < 0,05$ между соответствующими показателями в контрольном и опытном образцах.

У депрессивно-подобных реципиентов (СВАхС57BL/6)F1 после трансплантации сингенных спленоцитов, модулированных *ex vivo* кофеином, изменялось также количественное содержание ряда

цитокинов в патогенетически значимых для указанного состояния структурах головного мозга: в гипоталамусе выявлено снижение ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИНФ- γ ; в гиппокампе - снижение ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИНФ- γ , ФНО- α при повышении ИЛ-4 и ИЛ-10; в префронтальной коре - снижение ИНФ- γ , повышение ИЛ-10 в стриатуме (Рис. 6).



Примечание: Темные столбики - контрольная группа - образцы лизатов соответствующей структуры головного мозга депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации спленоцитов, прекультивированных без кофеина. Светлые столбики - опытная группа - образцы лизатов соответствующей структуры головного мозга депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации спленоцитов, прекультивированных с кофеином; * - $p < 0,05$; * * - $p < 0,01$ по сравнению с соответствующим показателем в контрольном образце.

Рисунок 6 - Содержание цитокинов (пг/мг ткани) в патогенетически значимых для состояния депрессивности структурах головного мозга депрессивно-подобных реципиентов (СВА х С57В1/6)F1 после трансплантации спленоцитов, модулированных *ex vivo* кофеином.

Следовательно, после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином ИКК у сингенных депрессивно-подобных реципиентов в патогенетически значимых структурах мозга регистрируется модуляция содержания цитокинов в сторону снижения провоспалительных и повышения противовоспалительных цитокинов, свидетель-

ствующая о снижении нейровоспаления, что, в свою очередь, обуславливает выявленную стимуляцию процессов нейропластичности (усиление нейрогенеза в гиппокампе и повышение уровня BDNF в гиппокампе и префронтальной коре) и редактирование депрессивно-подобного поведения.

Заключение

Экспериментальное моделирование депрессии - один из основных подходов для изучения патогенетических механизмов заболевания и поиска новых эффективных подходов к терапии. В результате проведенных исследований установлено, что клетки селезенки, выделенные у мышей в депрессивно-подобном состоянии и обработанные *in vitro* кофеином, изменяют свои функциональные свойства и после внутривенного введения сингенным депрессивно-подобным реципиентам оказывают выраженное позитивное иммуно- и психонейромодулирующее влияние, выражающееся в редактировании депрессивно-подобного фенотипа сингенных реципиентов, путем воздействия на основные патогенетические механизмы состояния депрессивности, что проявляется:

- в редактировании депрессивно-подобного поведения (снижение ангедонии, стимуляция ОИП, стимуляция двигательной активности в тесте «Принудительное плавание»);
- в модуляции функциональной активности иммунной системы (стимуляция антителообразования, пролиферативной активности спленцитов, на фоне подавления их провоспалительной активности и снижения катаболизма триптофана);
- в стимуляции процессов нейропластичности (усиление нейрогенеза в гиппокампе на фоне повышения уровня BDNF в гиппокампе и префронтальной коре);
- в изменении содержания ряда цитокинов в патогенетически значимых для состояния депрессивности структурах головного мозга (гиппокампе, гипоталамусе, префронтальной коре, стриатуме) свидетельствующем о снижении нейровоспаления.

Известно, что при депрессии провоспалительные цитокины, продуцируемые как периферическими ИКК, так и клетками ЦНС, изменяют нейрохимическую установку мозга, снижают BDNF и посредством связывания с TrkB рецепторами могут неблагоприятно влиять на нейрогенез и нейропластичность; они могут также воздействовать на систему глутамата путем активации фермента ИДО,

который катаболизирует триптофан, в кинуренин, с последующим образованием нейроактивных метаболитов, которые, в свою очередь, путем рецептор-опосредованного воздействия снижают нейротрансмиссию и повышают эксайтотоксичность. Это объясняет связь между депрессией, воспалением, психоэмоциональным стрессом и нейродегенеративными процессами, преимущественно регистрируемыми в гиппокампе. Показанная в исследовании стимуляция процессов нейропластичности после трансплантации модулированных кофеином ИКК, в частности, повышение уровня BDNF, может быть механизмом снижения ангедонии (главного признака депрессии у людей и состояниях депрессивности у лабораторных животных) посредством изменения в вентральных экстрапирамидных цепях, регулирующих мотивацию к поиску вознаграждения и избеганию стресса [Levchuk et al., 2020]. Апоптоз нейронов CA1 и CA3 полей гиппокампа также считается одним из патогенетических механизмов когнитивных нарушений при состояниях депрессивности [Тюренков и др., 2015; Doolin et al., 2018]. Принимая во внимание факт того, что гиппокампальный нейрогенез, снижение BDNF и нейровоспаление могут служить мишенями для терапии депрессивных расстройств [Remes et al., 2021; Eliwa et al., 2021; Duman et al., 2021], ИКК с модулированной *ex vivo* кофеином функциональной активностью можно рассматривать в качестве потенциального терапевтического агента с выраженным антидепрессантным эффектом, который проявляется в вышеуказанных позитивных изменениях в ЦНС и иммунной системе.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены новые данные о возможности редактирования депрессивно-подобного фенотипа модулированными *ex vivo* кофеином ИКК, что может служить экспериментальным обоснованием перспективности разработки новых технологий патогенетической иммунотерапии депрессивных расстройств аутологичными ИКК с экстракорпорально модулированной функциональной активностью.

Выводы

1. Спленциты депрессивно-подобных самцов (CBAxС57BL6)F1 после обработки *in vitro* кофеином характеризуются повышенной спонтанной и индуцированной пролиферативной активностью, изменением продукции ряда цитокинов: повышением спонтанной продукции ИЛ-2, спонтанной и митоген-стимулированной продук-

ции ИЛ-10 со снижением спонтанной продукции ФНО- α , спонтанной и митоген-стимулированной продукции ИЛ-1 β и ИНФ- γ , что свидетельствует о модуляции кофеином в условиях *ex vivo* функциональной активности иммунокомпетентных клеток селезенки мышей в депрессивно-подобном состоянии.

2. После трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином спленоцитов у сингенных депрессивно-подобных реципиентов (СВАхС57BL/6)F1 установлено усиление антителообразования в селезенке при системном иммунном ответе и повышение пролиферативной активности спленоцитов, что свидетельствует об иммуностимулирующем эффекте введенных клеток.

3. После трансплантации прекультивированных с кофеином спленоцитов у сингенных реципиентов (СВАхС57BL/6)F1 в депрессивно-подобном состоянии показана модуляция продукции клетками селезенки ряда цитокинов: снижение спонтанной продукции ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИНФ- γ ; стимулированной митогенами продукции ИЛ-6, ИНФ- γ , ФНО- α при повышении спонтанной продукции ИЛ-2, ИЛ-4, а также спонтанной и стимулированной продукции ИЛ-10, что указывает на влияние введенных клеток на продукцию цитокинов.

4. После трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином спленоцитов, у сингенных депрессивно-подобных реципиентов (СВАхС57BL/6)F1 выявлено снижение уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИНФ- γ в гипоталамусе, ИНФ- γ в префронтальной коре, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИНФ- γ и ФНО- α в гиппокампе при повышении уровня противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10 в гиппокампе и ИЛ-10 в стриатуме, что указывает на снижение нейровоспаления.

5. После трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином спленоцитов у сингенных депрессивно-подобных реципиентов (СВАхС57BL/6)F1 показаны повышение плотности пирамидных нейронов в CA1 и CA3 полях гиппокампа, повышение уровня BDNF в гиппокампе и префронтальной коре, что свидетельствует о стимуляции процессов нейропластичности в патогенетически значимых для состояния депрессивности структурах головного мозга.

6. После трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином спленоцитов у сингенных депрессивно-подобных реципиентов (СВАхС57BL/6)F1 установлено снижение ангедонии, выраженное увеличение временных периодов мобильности при снижении периодов пассивного плавания с исчезновением периодов полной непо-

движности в воде в тесте Порсолта, выраженная стимуляция моторного и исследовательского компонентов ориентировочно-исследовательского поведения, что свидетельствует о коррекции депрессивно-подобного поведения реципиентов.

7. Иммунокомпетентные клетки селезенки депрессивно-подобных мышей (CBAxС57BL/6)F1, модулированные *ex vivo* кофеином и введенные сингенным реципиентам в депрессивно-подобном состоянии путем воздействия на патогенетические механизмы депрессии оказывают выраженный позитивный психонейроиммунотулирующий эффект, обеспечивающий редактирование депрессивно-подобного фенотипа.

Список основных научных работ, опубликованных по теме диссертации.

Патент:

Маркова Е.В., **Княжева М.А.**, Савкин И.В., Тихонова М.А., Амстиславская Т.Г. Способ стимуляции нейрогенеза в гиппокампе. Патент на изобретение 2675111 //Изобретения и полезные модели. Официальный бюллетень федеральной службы по интеллектуальной собственности № 35 – 2018, 11.12. 2018 – 20.12.2018

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук:

- 1) Markova, E.V. Structural and functional characteristics of the hippocampus in depressive-like recipients after transplantation of *in vitro* caffeine-modulated immune cells /E.V. Markova, M.A. **Knyazheva**, M.A. Tikhonova, T.G. Amstislavskaya //Neuroscience Letters, 2022, 786, 136790. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136790>. (*Web of Science*)
- 2) Маркова, Е.В. Психонейроиммунотулирующий эффект иммунокомпетентных клеток при депрессивно-подобном состоянии /Е.В. Маркова, **М.А. Княжева** //Патогенез. -2022.-№ 3.– С. 107-108. doi: 10.25557/2310-0435.2022.03.107-108
- 3) Markova E.V. Immune cells as a potential therapeutic agent in the treatment of depression / E.V. Markova, **M.A. Knyazheva** //Medical Immunology (Russia). - 2021. –V. 23.- № 4. - P. 699-704. doi: 10.15789/1563-0625-ICA-2277. (*Scopus*)
- 4) Маркова, Е.В., Е.В. Влияние модулированных кофеином иммунных клеток на поведенческие паттерны депрессивно-подобных животных /Е.В. Маркова, **М.А. Княжева**, Т. Г. Амстиславская //Российский иммунологический журнал, 2019. - Т. 13 (22).- № 2-1. - С.397 -399. <https://doi.org/10.31857/S102872210006909-4> (*RSCI*)
- 5) Маркова, Е.В. Стимуляция пассивного поведения трансплантацией иммунокомпетентных клеток, экстракорпорально обработанных психоактивным препаратом /Е.В. Маркова, **М.А. Княжева**, Т.В. Шушпанова, В.А. Козлов //Сибирский вестник психиатрии и наркологии. - 2015.- №4 (89). - С.5-9.
- 6) Маркова, Е.В. Продукция цитокинов клетками головного мозга животных с пассивным типом поведения после трансплантации модулированных кофеином иммунокомпетентных клеток /Е.В. Маркова, **М.А. Княжева** //Российский иммунологический журнал. - 2015.-Т.9 (18). - № 2(1). - С. 88 – 90.

- 7) Markova, E.V. Immune cells functioning features in individuals with aggressive – and depressive – like behaviors/E.V. Markova, **M.A. Knyazheva**, T.V. Rumina, V.A. Kozlov // In the World of Scientific Discoveries. - 2014.-V.2.-N2.-P.45-55.
- 8) Маркова, Е.В. Стимуляция пассивного поведения у экспериментальных животных клетками иммунной системы / Е.В. Маркова, **М.А. Княжева** //Мир науки, культуры, образования. - 2014.-№ 6 (49). - С.589-592
- 9) Markova, E.V. Modulation of oriented - exploratory behavioral parameters and cytokines synthesis in brain of mice-recipients after transplantation of caffeine treated immune cells /E.V. Markova, **M. A. Knyazheva**, V. A. Kozlov // International Journal of Advanced Studies, 2014. –P. 17 – 22.
- 10) Маркова, Е.В. Особенности функционирования клеток иммунной системы у особой с агрессивно - и депрессивно-подобным типами поведения /Е.В. Маркова, **М.А. Княжева**, Т.В. Рюмина, В.А. Козлов //В мире научных открытий. - 2014.-№ 8(56). - С.131-148.
- 11) **Княжева, М.А.** Влияние трансплантации спленоцитов, прекультивированных с психомодулятором на параметры функциональной активности иммунной и нервной систем у сингенных реципиентов /М.А. Княжева, Е.В. Маркова //Российский иммунологический журнал. – 2013. –Т. 7(16). - № 2-3. - С.166 – 167.
- 12) Маркова, Е.В. Клеточные механизмы нейроиммунных взаимодействий в регуляции ориентировочно-исследовательского поведения /Е.В. Маркова, **М.А. Княжева**, В.А. Козлов //Сибирский вестник психиатрии и наркологии. - 2013. -№ 1(76). - С. 49-52.
- 13) **Княжева, М.А.** Влияние трансплантации обработанных кофеином иммунокомпетентных клеток на параметры функциональной активности нервной системы /М.А. Княжева, Е.В. Маркова, С.Л. Рыжикова, Т.Г. Рябичева //Бюллетень Восточно-Сибирского Научного Центра СО РАМН.- 2012.- № 3. Т.(85), часть 2.-С. 284-287.
- 14) **Княжева, М.А.** Влияние трансплантации спленоцитов, обработанных кофеином, на параметры поведения экспериментальных животных в тесте «открытое поле» /М.А. Княжева, Е.В. Маркова //Вестник уральской медицинской академической науки. - 2011. - №. 2/1- Т. (35). - С. 36-37.

Тезисы в журналах, включенных в международные базы научного цитирования:

- 1) Markova, E. Immune cells as a potential therapeutic agent in the treatment of depression / E. Markova, **M. Knyazheva** //European Psychiatry, 2022.- V. 65(S1). - P271-272. doi: 10.1192/j.eurpsy.2022.694. (*Web of Science*)
- 2) Markova, E. Prospects for Immunotherapy of Depression Based on Cell Technologies / E. Markova, **M. Knyazheva** //European Psychiatry, 2021.- V. 64 (S1). - P. 763-764. doi: 10.1192/j.eurpsy.2021.2022 (*Web of Science*)
- 3) Markova, E. Stimulation of neurogenesis in the hippocampus in depressive-like animals by modulated immune cells /E. Markova, **M. Knyazheva**, T. Amstislavskaya, M. Tichonova //European Psychiatry. -2019. - V. 56. - P. 122 – 123. doi.org/10.1016/j.eurpsy.2019.01.004 (*Web of Science*)
- 4) Markova, E. Psychoneuroimmunomodulating effect of immune cells treated with psychoactive drug in depressive – like animals /E. Markova, **M. Knyazheva**, I. Savkin, T.Amstislavskaya, M. Tichonova //European Psychiatry. - 2018. -V. - 48. - P. 293. doi.org/10.1016/j.eurpsy.2017.12.016 (*Web of Science*)
- 5) Маркова, Е.В. Купирование поведенческих паттернов депрессивно-подобного состояния у экспериментальных животных трансплантации модулированных психоактивным веществом иммунных клеток / Е.В. Маркова, **М.А. Княжева**, И.В. Савкин, М.А.Тихонова, Т.Г.Амстиславская //Медицинская иммунология. - 2017. - Т.19 (S). - С. 63. (*Scopus*)