

М.А. Княжева, С.Л. Рыжикова, Т.Г. Рябичева, Е.В. Маркова

**ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОБРАБОТАННЫХ КОФЕИНОМ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК НА ПАРАМЕТРЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

В настоящем исследовании продемонстрировано, что обработка in vitro кофеином спленоцитов мышей (СВАхС57В1/6)F1 с пассивным типом поведения в «открытом поле» влияет на функциональную активность указанных клеток, изменяя спонтанную и стимулированную продукцию цитокинов; а внутривенное введение этих клеток мышам с указанным типом поведения сопровождается модуляцией параметров их моторной и исследовательской активности, характер которой зависит от использованной дозы препарата. При этом регистрируются определенные изменения в синтезе цитокинов клетками головного мозга мышей-реципиентов. Обсуждаются возможные механизмы модулирующего поведения животных-реципиентов влияния обработанных кофеином трансплантированных иммунокомпетентных клеток.

Ключевые слова: кофеин, иммунокомпетентные клетки, ориентировочно-исследовательское поведение, цитокины

**EFFECT OF TRANSPLANTATION OF IMMUNOCOMPETENT CELLS TREATED
WITH CAFFEINE ON THE PARAMETERS OF THE NERVOUS SYSTEM FUNCTIONAL
ACTIVITY**

M.A. Knyazheva, S.L. Rizikova, T.G. Ryabicheva, E.V. Markova

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

It was demonstrated that in vitro treatment with caffeine splenocytes of mice (CBAxС57В1 / 6) F1 with a passive type of behavior in «open field» modifies the functional activity of these cells, manifested in changes in spontaneous and induced cytokine production; the intravenous injection of these cells is accompanied by modulation of the parameters of the motor and exploratory activity of recipients, the nature of which depends on the dose of caffeine. At the same time were shown some changes in the synthesis of cytokines by brain cells of mice -recipients. Possible mechanisms for modulating effect of transplanted immune cells on recipient's behavior were discussed.

Key words: caffeine, immune cells, exploratory behavior, cytokines

Новая интегративная наука, психонейроиммунология, появившаяся в последней трети XX века, с каждым годом все больше привлекает внимание исследователей. Это обусловлено тем, что понимание функционального единства иммунной и нервной систем, характера взаимодействия между ними открывает впечатляющие перспективы в самых различных областях экспериментальной и клинической медицины, позволяет пересмотреть лечебную тактику при борьбе со многими заболеваниями.

Нами изучается афферентное звено нейроиммунных взаимодействий, механизмы ответа мозга на активацию иммунной системы, участие иммуногенных факторов и клеточных элементов иммунной системы в регуляции его физиологических функций, в частности поведенческих реакций. Актуальность исследования афферентной организации взаимодействия иммунной и нервной систем, участия клеточных элементов иммунной системы и их цитокинов в регуляции поведенческих реакций, определяется как наличием широкого спектра неврозоподобных, аффективно-личностных, когнитивных и поведенческих нарушений, возникающих при вторичных иммунодефицитах вследствие повторных и хронически действующих экологических и социальных стрессоров, так и довольно активным

проведением в настоящее время различных иммунотерапевтических мероприятий, в том числе и клеточной терапии при различной патологии.

Ранее нами была продемонстрирована способность иммунокомпетентных клеток с определенными функциональными характеристиками направленно изменять уровень ориентировочно-исследовательского поведения у экспериментальных животных [3, 4, 5, 6, 12].

Целью настоящего исследования было изучение влияния трансплантации иммунокомпетентных клеток, обработанных экстракорпорально кофеином, на параметры поведения и синтез цитокинов в головном мозге животных-реципиентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ*Экспериментальные животные*

Работа выполнена на мышах-самцах (СВАхС57В1/6)F1 в возрасте трех месяцев; средний вес животных составлял 18–20 грамм. Животных содержали в условиях лабораторного вивария в клетках по 10 особей в каждой, не менее 2-х недель до начала эксперимента на стандартной диете, при свободном доступе к воде и нормальном световом режиме. Исследования проводились в соответствии с правилами принятыми Европейской кон-

венцией по защите позвоночных 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).

Выделение культивирование и трансплантация спленоцитов

Животных забивали путем цервикальной дислокации; в стерильных условиях вскрывали брюшную полость, извлекали селезенки, очищали их от соединительной ткани и помещали во флаконы с охлажденной до 4 °С средой 199 (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор») в объеме 5 мл на селезенку. Выделенные селезенки измельчали на мельчайшие кусочки при помощи ножниц. Образовавшуюся в результате измельчения суспензию клеток осторожно ресуспендировали с помощью шприца, для того, чтобы распались оставшиеся скопления клеток, центрифугировали 8 мин при 150 g. После удаления надосадочной жидкости, находящиеся в осадке спленоциты ресуспендировали в среде RPMI-1640. Жизнеспособность клеток определяли при помощи окраски трипановым синим.

Клетки селезенки обрабатывали *in vitro* кофеином из расчета 15 × 10⁶ клеток / 10 мкг/100 мкг/500 мкг/1000 мкг/2000 мкг кофеина в присутствии 3% FCS (Hyclone) в течение 25 минут. Затем, после 3-кратного отмывания, прекультивированные с кофеином спленоциты внутривенно вводили мышам-реципиентам в концентрации 15 × 10⁶ клеток в объеме 0,3 мл физиологического раствора на одно животное. В контрольной группе животных подготовка и трансплантация спленоцитов проводилась в аналогичных условиях эксперимента, за исключением того, что последние культивировались без присутствия кофеина.

Изучение поведения животных в тесте «открытое поле»

Ориентировочно-исследовательское поведение животных оценивали в тесте «открытое поле» [2]. Для этого использовалась большая прямоугольная камера (100 × 100 см) с пластмассовыми стенками высотой 40 см. Полком служил лист белого пластика, на который черной краской нанесена решётка, делящая поле на 100 (10 × 10) равных квадратов. Освещение проводилось бестеневой лампой мощностью 100 Вт, расположенной на высоте 100 см над центром поля. Животное помещалось в угол камеры и регистрировалась его моторная и исследовательская активность в течение 5 минут с интервалом в 1 минуту. Для каждого животного подсчитывалось число пересеченных центральных и периферических квадратов, число вертикальных стоек (свободных и с опорой на стенку поля), суммарная горизонтальная и вертикальная двигательная активность. С целью определения степени эмоциональной реактивности регистрировалось число фекальных болусов. Все эксперименты проводились в период времени с 10 до 14 часов.

В экспериментах использовались животные, характеризующиеся пассивным типом поведения в «открытом поле».

Определение цитокинов

Количественное содержание цитокинов определяли в образцах культуральных супернатантов трансплантируемых клеток, а также в лизатах головного мозга животных — реципиентов. Для этого спленоциты культивировали в концентрации 2 × 10⁶/мл в объеме 2 мл в 24-луночных планшетах для иммунологических исследований (Linbro) в полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone), 2 mM L-глутамина (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»), 10 mM HEPES-буфера (Sigma) и 80 мкг/мл гентамицина («Синтез») при добавлении к части спленоцитов (для стимуляции продукции ИФН-γ, ИЛ-4, и ИЛ-10) конканавалина А (Pharmacia) в концентрации 5 мкг/мл, а к части (для стимуляции продукции ФНОα, ИЛ-1β и ИЛ-6) липополисахарида *Escherichia coli* Serotype 055:B5 (Sigma) в концентрации 10 мкг/мл.

Клетки культивировали в течение 24 часов для исследования продукции ИЛ-1β и ФНОα; 48 часов для ИЛ-4 и ИЛ-6 и 72 часов для исследования продукции ИФН-γ. По окончании периода культивирования клеточную суспензию собирали, клетки осаждали центрифугированием, а культуральный супернатант использовали для исследования.

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

Содержание цитокинов в исследуемых образцах оценивали методом ИФА (ELISA) с использованием специфических компонентов к цитокинам мыши производства фирмы «R&D Systems» (Великобритания). Принцип анализа «sandwich» — вариант твердофазного трехстадийного иммуноферментного анализа на планшетах (моноклональные антитела на подложке, конъюгат поликлональных антител с биотином) по технологии, разработанной в ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия) для определения цитокинов.

Статистическая обработка результатов

Результаты обрабатывались с применением парного критерия Манна — Уитни (компьютерная программа Statistica 6.0). Результаты представлены в виде $M \pm SD$. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трансплантация спленоцитов, обработанных кофеином, сопровождалась неоднозначными изменениями параметров ориентировочно-исследовательского поведения мышей — реципиентов, характер которых определялся используемой концентрацией препарата (табл. 1).

Стимуляция моторного и исследовательского компонентов указанного поведения регистрировалась после трансплантации клеток, прекульти-

Таблица 1

Параметры ориентировочно-исследовательского поведения животных – реципиентов после трансплантации спленоцитов, прекультивированных с кофеином ($M \pm SD$)

Группы животных-реципиентов	Горизонтальная двигательная активность			Вертикальная двигательная активность		
	периферическая	центральная	суммарная	свободная	с опорой на стенку	суммарная
контроль ($n = 29$)	1,9 $\pm$ 2,8	0	0,9 $\pm$ 2,8	0	0,4 $\pm$ 0,7	0,4 $\pm$ 0,7
опыт 1 ($n = 21$)	72,5 $\pm$ 89,1*	0,8 $\pm$ 2,8*	73,3 $\pm$ 88,6*	3,6 $\pm$ 4,9*	0,8 $\pm$ 1,9*	4,4 $\pm$ 6,1*
опыт 2 ($n = 21$)	98,5 $\pm$ 126,0*	0,2 $\pm$ 0,6	93,9 $\pm$ 127,4*	0,3 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 3,1*	3,0 $\pm$ 3,1*
опыт 3 ($n = 12$)	25,5 $\pm$ 26,6*	0	25,5 $\pm$ 26,6*	0,3 $\pm$ 1,2	0,7 $\pm$ 1,2	1,0 $\pm$ 2,1
опыт 4 ($n = 14$)	6,2 $\pm$ 13,9	0	6,2 $\pm$ 13,9	0,5 $\pm$ 1,2	0	0,5 $\pm$ 1,2
опыт 5 ($n = 19$)	0,8 $\pm$ 2,9	0	0,8 $\pm$ 2,9	0,1 $\pm$ 0,5	0,01 $\pm$ 0,2	0,16 $\pm$ 0,68

Примечание: опыт 1 – трансплантация спленоцитов обработанных кофеином в концентрациях 10 мкг на одно животное; опыт 2 – трансплантация спленоцитов обработанных кофеином в концентрации 100 мкг на одно животное; опыт 3 – трансплантация спленоцитов обработанных кофеином в концентрации 500 мкг на одно животное; опыт 4 – трансплантация спленоцитов обработанных кофеином в концентрации 1000 мкг на одно животное; опыт 5 – трансплантация спленоцитов обработанных кофеином в концентрации 2000 мкг на одно животное.
* – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой животных.

вированных с кофеином в низких концентрациях (10 мкг, 100 мкг/мышь), о чем свидетельствует повышение параметров горизонтальной и вертикальной двигательной активности реципиентов в тесте «открытое поле». При трансплантации спленоцитов, обработанных кофеином в концентрации 500 мкг/мышь наблюдалась достоверная стимуляция только моторного компонента поведения за счет повышения показателей периферической горизонтальной двигательной активности. Трансплантация спленоцитов, обработанных кофеином в концентрации 1000 мкг/мышь и выше, вызывала у реципиентов дезорганизацию поведения.

Учитывая полученные результаты, в дальнейших экспериментах, для обработки трансплантируемых иммунокомпетентных клеток использовалась оптимальная концентрация кофеина, стимулирующая поведение мышей-реципиентов в «открытом поле», которая составляла 100 мкг/мышь.

При трансплантации указанных клеток у реципиентов наряду с повышением параметров ориентировочно-исследовательского поведения регистрировались определенные изменения уровня провоспалительных цитокинов в головном

мозге – снижение содержания ФНО α , ИЛ-1 β и ИНФ γ (табл. 2).

При оценке функциональной активности спленоцитов, обработанных *in vitro* кофеином в концентрации 100 мкг/мышь, было установлено, что указанное воздействие модулирует продукцию клетками цитокинов. Так, наблюдалось достоверное повышение спонтанной (6,77 $\pm$ 0,4 и 11,91 $\pm$ 1,3 пг/мл в супернатантах спленоцитов контрольной и опытной группы соответственно; $p < 0,05$) и стимулированной ЛПС продукции ФНО α (10,28 $\pm$ 3,0 и 17,14 $\pm$ 4,8 пг/мл в культуральных супернатантах спленоцитов контрольной и опытной группы соответственно; $p < 0,05$); а также ИЛ-6 (2,08 $\pm$ 0,3 и 4,90 $\pm$ 2,5 пг/мл в супернатантах спленоцитов контрольной и опытной группы соответственно; $p < 0,05$).

Известно, что циркулирующие цитокины способны проникать через гематоэнцефалический барьер и модулировать когнитивные функции, воздействуя на нейроны, нейрональное проведение сигнала и активность нейромедиаторных систем головного мозга. [7, 11, 13]. Ранее нами было показано, что трансплантация спленоцитов с высокой продукцией ИЛ-6 сопровождается у сингенных

Таблица 2

Содержание цитокинов (пг/мл) в лизатах головного мозга животных-реципиентов после трансплантации спленоцитов, прекультивированных с кофеином ($M \pm SD$)

Цитокины	Группы животных – реципиентов	
	Контрольная группа ($n = 10$)	Опытная группа ($n = 9$)
ФНО α	792,6 $\pm$ 22,3	53,6 $\pm$ 13,3*
ИЛ-1 β	705,8 $\pm$ 55,5	591,5 $\pm$ 73,0*
ИЛ-6	108,39 $\pm$ 11,2	102,11 $\pm$ 10,5
ИЛ-4	182,69 $\pm$ 27,2	183,21 $\pm$ 21,3
ИНФ γ	425,5 $\pm$ 65,3	307,6 $\pm$ 65,2*
ИЛ-10	366,11 $\pm$ 38,6	345,40 $\pm$ 34,1

Примечание: * – $p < 0,05$ между контрольной и опытной группами животных.

мышей-реципиентов стимуляцией исследовательского компонента поведения посредством усиления экспрессии гена рецептора эритропоэтина в головном мозге [3]. Полученный эффект может быть также следствием стимулирующего влияния указанного цитокина на активность дофаминергической системы головного мозга [10, 14], равно как и его способности индуцировать в мозге синтез антагонистов рецептора ИЛ-1 и растворимого рецептора ФНО — р55 [11, 14]. Последнее может также нивелировать супрессирующий эффект на поведение реципиентов ФНО α , продукция которого также повышена трансплантируемыми клетками. Существенное значение в модуляции параметров ориентировочно-исследовательского поведения животных после трансплантации спленоцитов, обработанных *in vitro* кофеином, имеет и выявленное в настоящем исследовании снижение в головном мозге реципиентов локального синтеза провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6, оказывающих депрессивные эффекты на поведенческие реакции [7, 8, 13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящем исследовании, продемонстрировано модулирующее влияние трансплантации иммунокомпетентных клеток, обработанных экстракорпорально кофеином, на параметры поведения экспериментальных животных. Стимулирующий поведение реципиентов эффект, сопровождающийся снижением содержания ряда провоспалительных цитокинов в головном мозге, достигался при трансплантации иммунокомпетентных клеток, обработанных кофеином в низкой концентрации. Можно полагать, что в качестве триггерных факторов, приводящих к изменениям функциональной активности ЦНС у животных-реципиентов при этом выступают продуцируемые трансплантируемыми клетками цитокины. По всей видимости, головной мозг реагирует на изменение цитокинового профиля на периферии и отвечает на этот стимул модуляцией собственного локального синтеза цитокинов и активности нейромедиаторных систем, следствием чего и являются регистрируемые изменения параметров ориентировочно-исследовательского поведения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. — М., 1991. — 399 с.
2. Маркова Е.В., Абрамов В.В., Козлов В.А. Влияние трансплантации лимфоидных клеток селезенки на функциональную активность иммунной

и нервной систем у экспериментальных животных // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. — 2009. — Т. 147, № 4. — С. 435 — 441.

3. Маркова Е.В., Абрамов В.В., Козлов В.А. Регуляция ориентировочно-исследовательского поведения у животных путем трансплантации иммунокомпетентных клеток // Успехи современ. биологии. — 2009. — Т. 129, № 4. — С. 348 — 355.

4. Маркова Е.В., Козлов В.А. Механизмы регуляции ориентировочно-исследовательского поведения мышей (СВАхС57Bl/6)F1 иммунокомпетентными клетками // Вестн. уральской мед. акад. науки. — 2010. — № 2/1. — С. 49 — 51.

5. Маркова Е.В., Абрамов В.В., Короткова Н.А., Козлов В.А. Влияние трансплантации иммунокомпетентных клеток на ориентировочно-исследовательское поведение и экспрессию генов цитокинов в головном мозге животных // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. — 2006. — Т. 142, № 9. — С. 309 — 313.

6. Ader Robert. Psychoneuroimmunology. — University of Chicago Press, 2007. — Vol. 1. — 1269 p.

7. Dantzer R. Expression and action of cytokines in the brain: mechanisms and and pathophysiological implications // In: Psychoneuroimmunology (4-th ed.). San Diego (Ca): Elsevier Academic Press (ed. Ader R.), 2007. — Vol. 1. — P. 271 — 280.

8. Dunn A.J. Mechanisms by which cytokines signal the brain // Int. Rev. Neurobiol. — 2002. — Vol. 52. — P. 43 — 65.

9. Dunn A.J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry // In: Psychoneuroimmunology, eds. R. Ader, D.L. Felten, N. Cohen. — New York, 2001. — P. 649 — 666.

10. Hopkins S.J. Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural, hormonal collaboration // Acta Biomed. — 2007. — Vol. 78, N 1. — P. 231 — 247.

11. Markova E.V., Abramov V.V., Kozlov V.A. Proceedings of the 2nd European Congress of Immunology // Free Papers. Editors Reinhold E. Schmidt. MED-IMOND S.r.l. — Bologna, Italy, 2009. — P. 551 — 555.

12. Siegel A., Zalcman S.S. The Neuroimmunological Basis of Behavior and Mental Disorders // Springer Science and Business Media LLC, 2009. — 438 p.

13. Tilg H., Trehu E., Atkins M.B., Dinarello C.A. et al. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor // Blood. — 1994. — Vol. 83. — P. 113 — 118.

14. Zalcman S., Green-Johnson J.M., Murray L. Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6 // Brain Res. — 1994. — Vol. 643. — P. 40 — 49.

Сведения об авторах

Княжева Мария Александровна — младший научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: (383) 222-06-72)

Рыжикова Светлана Леонидовна — научный сотрудник лаборатории стабилизации ЗАО «Вектор-Бест»

Рябичева Татьяна Григорьевна — ведущий научный сотрудник лаборатории стабилизации ЗАО «Вектор-Бест», кандидат биологических наук

Маркова Евгения Валерьевна — ведущий научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН, доктор медицинских наук