

# Особенности субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови и селезенки у мышей линии ASC (Antidepressants Sensitive Catalepsy) с наследственной предрасположенностью к депрессивноподобному поведению\*

АЛЬПЕРИНА Е.Л., ГЕВОРГЯН М.М., ИДОВА Г.В.

ФГБУ «НИИ физиологии» СО РАН, Новосибирск, Россия

## Введение

Депрессивные расстройства представляют одну из наиболее актуальных проблем современной психиатрии, что обусловлено их высокой распространенностью, многообразием форм, этиологической и нейрохимической гетерогенностью. Несмотря на большой объем полученных в этой области исследований клинических и экспериментальных данных, базисные механизмы депрессий до сих пор во многом остаются неизученными.

Патогенез депрессивных состояний связан с нарушением функций не только различных нейрорегуляторных систем организма (моноаминергические и нейроэндокринная системы, нейропептиды, нейротрофические факторы), но и иммунной системы [3, 9, 13—15].

В связи с тем, что характер этих отклонений зависит от воздействия многих факторов, изучение патогенетических механизмов данного заболевания с анализом отдельных составляющих общего синдрома требует использования экспериментальных моделей депрессий разного генеза — эндогенных, стрессогенных, генетически обусловленных.

В качестве наследственно обусловленной модели депрессии была предложена линия мышей ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy), полученная в лаборатории нейрогенетики поведения Института цитологии и генетики СО РАН в результате длительной селекции гибридов между линиями CBA/Lac и AKR/ICg и отличающаяся от родительских линий выраженным депрессивноподобным поведением, а также чувствительностью к хроническому введению антидепрессантов [2, 16]. Другой характерной чертой ASC мышей является более низкая, чем у родительских линий, не имеющих признаков депрессии, иммунная реактивность [1, 7].

Известно, что формирование депрессивноподобного состояния в условиях хронического социального стресса у мышей линии C57BL/6J также приводит к иммуносупрессии, которая сопровождается изменением содержания CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в иммунокомпетентных органах как до, так и после иммунизации [4, 6, 8, 10].

Учитывая вышесказанное, представляло интерес выяснить, существуют ли у интактных и иммунизированных мышей линии ASC с генетической предрасположенно-

стью к депрессивноподобному поведению особенности субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в периферической крови и селезенке по сравнению с мышами родительской линии CBA без депрессивных проявлений.

## Материалы и методы

Эксперименты проведены на половозрелых самцах: 100 мышках линии CBA/Lac и 100 мышках линии ASC/ICg (20-е поколение селекции), в возрасте 2—2,5 мес., массой 25—30 г. Животные были получены из вивария Института цитологии и генетики СО РАН, где они содержались в стандартных условиях при постоянном световом режиме и получали пищу и воду без ограничений. Опыты были проведены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директивах Европейского Сообщества (86/609/ЕС), и одобрены Комитетом по биомедицинской этике НИИ физиологии СО РАН.

В периферической крови и селезенке интактных мышей линий ASC и CBA методом проточной цитофлуориметрии определяли процентное содержание: CD4-позитивных лимфоцитов, которые относятся, главным образом к Т-хелперам; CD8-позитивных лимфоцитов, в основном супрессорных/цитотоксических Т-лимфоцитов и CD16/32 клеток, которые являются естественными киллерами (ЕК). Для иммунофенотипирования клеток использовали моноклональные антитела к CD4, меченные флуоресцином-5-изотиоцианатом, антитела к CD8 и CD16/32, меченные фикоэритрином. Удаление эритроцитов в исследуемых пробах периферической крови и селезенки осуществляли раствором BD FASC Lysin Solution «Becton Dickinson», USA с последующим 3-разовым отмыванием клеток. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («Becton Dickinson», USA), используя программное обеспечение «CellQuest Pro». В каждой пробе анализировали не менее 3000 лимфоцитов. По отношению числа CD4<sup>+</sup> к CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитам (CD4/CD8) вычисляли «индекс иммунореактивности».

Иммунизацию мышей обеих линий осуществляли ЭБ, которые вводили в хвостовую вену однократно в дозе  $5 \times 10^8$  клеток в 0,5 мл физиологического раствора.

\* Авторы выражают благодарность с.н.с. лаб. нейрогенетики поведения ФГБУН Института цитологии и генетики СО РАН д.б.н., профессору А.В. Куликову за предоставление животных.

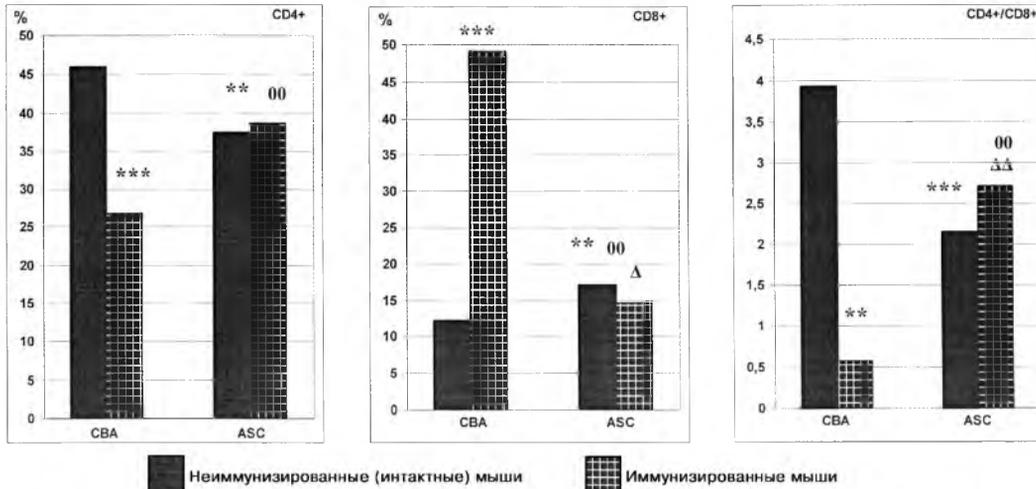


Рис. 1. Содержание (%)  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клеток и их соотношение ( $CD4^+/CD8^+$ ) в периферической крови у мышей линий ASC и CBA: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  по сравнению с неиммунизированными мышами линии CBA; 0 –  $p < 0,05$ ; 00 –  $p < 0,01$ ; 000 –  $p < 0,01$  по сравнению с иммунизированными мышами линии CBA;  $\Delta$  –  $p < 0,05$ ;  $\Delta\Delta$  –  $p < 0,01$  по сравнению с неиммунизированными мышами линии ASC

Статистическую оценку различий между средними значениями показателей проводили путем парного сравнения по  $t$ -критерию Стьюдента и с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с использованием компьютерной программы «Statistica for Windows» ver. 10.

### Результаты и обсуждение

Анализ субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови и селезенки обнаружил существенные различия в процентном содержании  $CD16/32^+$ ,  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клеток у интактных мышей линий ASC и CBA, главным отличием которых является способность проявлять депрессивноподобное поведение.

Так, в периферической крови у мышей линии ASC процентное содержание  $CD4^+$ -клеток было существенно ниже, чем у мышей линии CBA ( $F(1,24)=16,3$ ;  $p < 0,001$ ), а число  $CD8^+$ -лимфоцитов, напротив, повышено ( $F(1,25)=42,7$ ;  $p < 0,001$ ), что приводило к уменьшению индекса иммунореактивности — показателя соотношения этих клеточных популяций ( $CD4/CD8$ ) ( $F(1,24)=39,0$ ;  $p < 0,001$ ) (рис. 1).

Аналогичное изменение соотношения  $CD4^+$  и  $CD8^+$ -Т-лимфоцитов происходило и в селезенке интактных ASC мышей: на фоне уменьшения количества  $CD4^+$ -Т-лимфоцитов ( $F(1,33)=4,3$ ;  $p < 0,05$ ) нарастало число  $CD8^+$  клеток ( $F(1,27)=4,0$ ;  $p < 0,05$ ) и, как следствие, снижался индекс иммунореактивности ( $F(1,31)=7,0$ ;  $p < 0,05$ ) (рис. 2).

Кроме того, в селезенке мышей линии ASC снижалось процентное содержание  $CD16/32^+$  клеток ( $F(1,22)=10,7$ ,  $p < 0,01$ ), хотя в периферической крови их количество не различалось ( $F(1,13)=0,8$ ,  $p > 0,05$ ).

Особенности поведения мышей линии ASC, такие как увеличение времени неподвижности в тестах «tail suspension» и «принудительное плавание», снижение двигательной активности и исследовательского поведения в тесте «открытое поле», половой мотивации, агрессивности [2, 16], нарушение процесса угашения условной реакции пассивного избегания [5], а также повышенная чувствительность к хроническому введению антидепрессантов [16] свидетельствуют о наличии у них депрессивноподобного состояния.

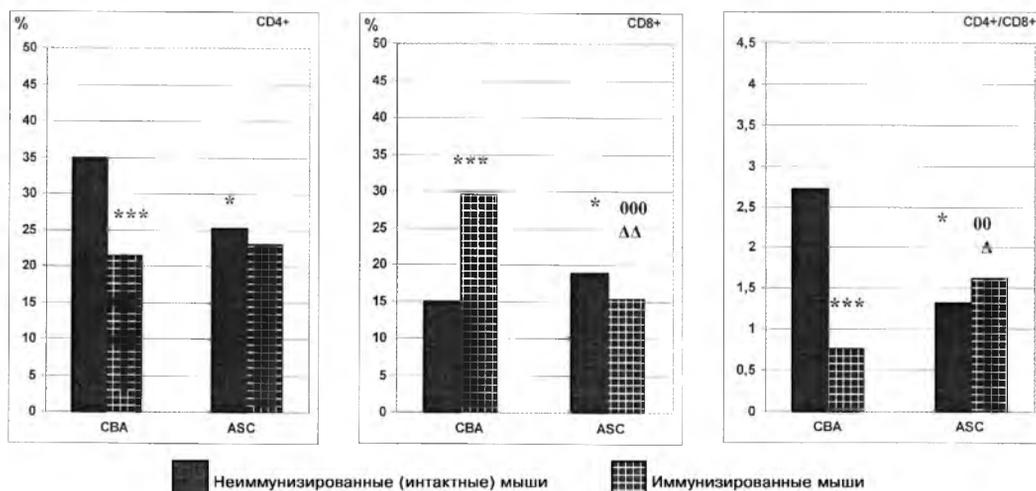


Рис. 2. Содержание (%)  $CD4^+$  и  $CD8^+$  клеток и их соотношение ( $CD4^+/CD8^+$ ) в селезенке у мышей линий ASC и CBA: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  по сравнению с неиммунизированными мышами линии CBA; 0 –  $p < 0,05$ ; 00 –  $p < 0,01$ ; 000 –  $p < 0,01$  по сравнению с иммунизированными мышами линии CBA;  $\Delta$  –  $p < 0,05$ ;  $\Delta\Delta$  –  $p < 0,01$  по сравнению с неиммунизированными мышами линии ASC

Кроме того, мыши данной линии характеризуются более низкой, чем у родительских линий, способностью отвечать на Т-зависимый антиген, а именно снижением в селезенке числа IgM-антителообразующих клеток (АОК) на 4 и 5 дни после иммунизации ЭБ, а на 6 день — IgG-АОК [1, 7].

В настоящей работе установлено, что генетически детерминированное депрессивноподобное состояние у интактных (неиммунизированных) мышей линии ASC сопровождается падением в селезенке числа ЕК, несущих маркер CD16/32<sup>+</sup>, а также изменением содержания в периферической крови и селезенке CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеточных субпопуляций, выполняющих соответственно хелперную и супрессорную/цитотоксическую функцию, по сравнению с родительской для этих мышей линией СВА без признаков депрессии.

Существуют многочисленные данные о том, что психопатологические состояния, включая и депрессивные расстройства, оказывают значительное влияние на иммунологическую функцию [3, 9, 13-15]. При этом многие авторы отмечают изменения функциональной активности и количества различных клеточных субпопуляций, их перераспределение в иммунокомпетентных органах, среди которых CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты являются наиболее чувствительными к воздействиям стрессогенных психоэмоциональных факторов [4, 6, 8, 9, 11, 12, 15].

Можно полагать, что существующие различия в содержании CD16/32<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток в периферической крови и селезенки у мышей двух линий — СВА и ASC обусловлены предрасположенностью ASC мышей к выраженному депрессивноподобному поведению и сопряженными с ним нейрохимическими и гормональными нарушениями, приводящими к перераспределению основных субпопуляций Т-лимфоцитов.

Это предположение хорошо согласуется с данными, полученными при использовании другой модели депрессии. Так, показано, что у мышей линии C57BL/6J с депрессивноподобным состоянием, сформированным в ситуации хронического социального стресса, еще до иммунизации происходит перераспределение субпопуляций CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов с их накоплением в костном мозге [4, 5, 8], а также уменьшение числа CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>Т-клеток в тимусе, селезенке и лимфатических узлах [10]. Важно отметить, что проявление депрессии у C57BL/6J мышей, так же как и у мышей линии ASC, сопровождается угнетением иммунного ответа на ЭБ [4, 5, 8], при этом в костном мозге таких животных обнаруживаются более глубокие различия в соотношении CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов.

В связи с этим возникает вопрос, будет ли у мышей линии ASC, депрессивноподобное поведение которых обусловлено влиянием не эмоциональных, а генетических факторов, также изменяться содержание основных Т-клеточных субпопуляций в иммунокомпетентных органах после антигенной стимуляции.

И, действительно, на 4 день после иммунизации (ЭБ в дозе  $5 \times 10^8$  клеток) соотношение CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в периферической крови и селезенки у мышей линий СВА и ASC существенно отличалось.

В периферической крови у иммунизированных СВА мышей число CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов было снижено по сравнению с неиммунизированными мышами этой же линии ( $F(1,30)=89,9$ ;  $p<0,001$ ). В то же время количество CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов у ASC мышей после введения антигена практически не отличалось от их содержания у неим-

мунизированных ASC мышей, но по сравнению с иммунизированными мышами линии СВА было существенно выше ( $F(1,28)=40,51$ ;  $p<0,01$ ) (рис. 1).

Что касается субпопуляции клеток с фенотипом CD8<sup>+</sup>, то после иммунизации их количество в периферической крови у родительской линии резко увеличилось ( $F(1,30)=172,6$ ;  $p<0,001$ ), а у ASC мышей, наоборот, уменьшилось по сравнению как с неиммунизированной группой ASC мышей ( $F(1,24)=7,79$ ;  $p<0,05$ ), так и мышами линии СВА, получившими антиген ( $F(1,28)=126,1$ ;  $p<0,001$ ) (рис. 1).

Индекс иммунореактивности при этом у контрольных мышей СВА после иммунизации резко упал по сравнению с неиммунизированными животными ( $F(1,28)=199,39$ ;  $p<0,01$ ), в то время как у ASC мышей с депрессивноподобным поведением соотношение CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>Т-клеток стало выше как по сравнению с его значением до иммунизации ( $F(1,23)=8,79$ ;  $p<0,01$ ), так и по сравнению с индексом мышей контрольной линии ( $F(1,27)=250,7$ ;  $p<0,001$ ) (рис. 1).

Оценка после иммунизации содержания CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в селезенке у мышей линий ASC и СВА выявила сходную с периферической кровью картину распределения этих клеточных субпопуляций.

Так, у иммунизированных СВА мышей число CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в селезенке было существенно ниже, чем у неиммунизированных ( $F(1,41)=14,61$ ;  $p<0,001$ ), в то время как у мышей линии ASC после введения ЭБ имела лишь тенденция к снижению количества этих клеток по сравнению с неиммунизированными животными данной линии (рис. 2).

Как и в периферической крови, в селезенке СВА мышей процентное содержание CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов после иммунизации значительно превысило их уровень, наблюдаемый у неиммунизированных животных ( $F(1,39)=22,25$ ;  $p<0,001$ ), а у мышей линии ASC количество CD8<sup>+</sup> клеток в селезенке уменьшилось не только по сравнению с интактными ASC мышами ( $F(1,32)=36,29$ ;  $p<0,01$ ), но и иммунизированными мышами линии СВА ( $F(1,32)=36,29$ ;  $p<0,001$ ) (рис. 2).

В результате этих изменений соотношение CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> в селезенке иммунизированных СВА мышей стало существенно ниже, чем до иммунизации ( $F(1,41)=26,88$ ;  $p<0,001$ ), а индекс иммунореактивности у мышей линии ASC, напротив, увеличился по сравнению с неиммунизированными мышами этой линии ( $F(1,30)=5,13$ ;  $p<0,05$ ) и еще в большей степени по сравнению с СВА мышами, иммунизированными ЭБ ( $F(1,32)=38,74$ ;  $p<0,01$ ) (рис. 2).

Таким образом, мыши линии ASC с генетической предрасположенностью к депрессивноподобному состоянию, в отличие от своей родительской линии СВА, не проявляющей депрессивного поведения, характеризуются разнонаправленным изменением соотношения Т-клеточных субпопуляций в периферической крови и селезенке до и после иммунизации: снижением индекса иммунореактивности у интактных животных и его увеличением в ответ на введение антигена.

Следует отметить, что после иммунизации и в периферической крови, и в селезенке у мышей линии СВА количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов менялось даже более резко, чем у мышей линии ASC. Известно, что введение антигена само по себе вызывает изменения в соотношении клеточных субпопуляций в иммунокомпетентных органах, что, по-видимому, и привело к сдвигам в содержании CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток у обеих линий мышей независимо от особенностей их поведенческих реакций, хотя направленность этих изменений имела противоположный характер.

Можно полагать, что проявление у мышей линии ASC выраженного депрессивноподобного поведения сопряжено с перераспределением клеток, участвующих в формировании иммунного ответа, которое отражается не только на исходной картине распределения CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в периферической крови и селезенке, но и на их субпопуляционном составе после поступления в организм антигена.

#### Список литературы

1. Альперина Е.Л., Куликов А.В., Попова Н.К., Идова Г.В. Характер иммунного ответа у мышей новой линии ASC (Antidepressants sensitive catalepsy) // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2007. — Т. 144, №8. — С. 188—190.
2. Базовкина Д.В., Куликов А.В., Кондаурова Е.М., Попова Н.К. Селекция на предрасположенность к катаlepsии усиливает депрессивно-подобное поведение у мышей // Генетика. — 2005. — Т. 41, №9. — С. 1222—1228.
3. Ветлугина Т.П., Невидимова Т.И., Лобачева О.А., Никитина В.Б. Технология иммунокоррекции при психических расстройствах. — Томск: Изд-во Том. ун-та, 2010. — 171 с.
4. Девойно Л.В., Идова Г.В., Альперина Е.Л. Психонейроиммунотуляция: поведение и иммунитет. Роль «нейромедиаторной» установки мозга. — Новосибирск: Наука, 2009. — 167 с.
5. Дубровина Н.И., Зиновьев Д.Р., Зиновьева Д.В., Куликов А.В. Обучение и угашение реакции пассивного избегания у мышей с высокой предрасположенностью к катаlepsии // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. — 2008. — Т. 94, №6. — С. 609—616.
6. Идова Г.В., Павина Т.А., Альперина Е.Л., Девойно Л.В. Влияние субмиссивного и агрессивного типов поведения на изменение числа CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в костном мозге // Иммунология. — 2000. — №1. — С. 24—26.
7. Идова Г.В., Альперина Е.Л., Геворгян М.М., Жукова Е. Н., Куликов А.В., Юрьев Д.В. Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов и иммунный ответ при депрессивно-подобном поведении у мышей линии ASC // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. — 2012а. — Т. 98, №2. — С. 134—141.
8. Идова Г.В., Альперина Е.Л. Роль серотонинергических механизмов в нейроиммунотуляции при депрессивных состояниях // Нейроиммунология. — 2012б. — Т. X, №1—2. — С. 4—10.
9. Крыжановский Г.Н., Акмаев И.Г., Магаева С.В., Морозов С.Г. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в норме и патологии. — М.: Мед. Книга, 2010. — 288 с.
10. Тендитник М.В., Шурлыгина А.В., Мельникова Е.В., Кудрявцева Н.Н., Труфакин В.А. Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов иммунокомпетентных органов мышей под влиянием хронического социального стресса // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. — 2004. — Т. 90, №12. — С. 1522—1529.
11. Хантов Р.М., Лесков В.П. Иммунитет и стресс // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. — 2001. — Т. 87, №8. — С. 1060—1072.
12. Engler H., Bailey M.T., Engler A., Sheridan J.F. Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen // J. Neuroimmunol. — 2004. — Vol. 148, №1—2. — P. 106—115.
13. Irwin M.R., Miller A.H. Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery // Brain Behav. Immun. — 2007. — Vol. 21, №4. — P. 374—383.
14. Littrell J.L. Taking the perspective that a depressive state reflects inflammation: Implications for the use of antidepressants // Front Physiol. — 2012. — Vol. 3. — 297.
15. Maes M. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. — 2011. — Vol. 35, №3. — P. 664—675.
16. Tikhonova M.A., Alperina E.L., Tolsticova T.G., Bazovkina D.V., Di V.Yu., Idova G.V., Kulikov A.V., Popova N.K. Effects of chronic fluoxetine treatment on catalepsy and the immune response in mice with a genetic predisposition to freezing reactions: the roles of types 1A and 2A serotonin receptors and the tph2 and SERT genes // Neurosci. Behav. Physiol. — 2010. — Vol. 40, №5. — P. 521—527.