

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 616.8-092

ЦЕНТРАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКИ ВВЕДЕННЫХ ИММУННЫХ КЛЕТОК, МОДУЛИРОВАННЫХ ОРИГИНАЛЬНЫМ АНТИКОНВУЛЬСАНТОМ, ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛКОГОЛИЗМЕ

© 2023 г. Е. В. Маркова¹*, И. В. Савкин¹, Е. В. Серенко¹, М. А. Княжева¹, Ю. А. Шевченко¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 18.03.2023 г.

Принята к публикации 31.03.2023 г.

Нарушение нейроиммунных регуляторных связей, обусловленное, в частности, изменением функционального фенотипа иммунокомпетентных клеток вследствие хронической интоксикации этанолом является существенным звеном в патогенезе алкоголизма. Однонаправленное влияние большинства психоактивных препаратов на клетки нервной и иммунной систем позволяет рассматривать иммунокомпетентные клетки в качестве модельных объектов для воздействия на межсистемную функциональную взаимосвязь. На основании собственных приоритетных данных о наличии иммуномодулирующих свойств при хронической алкогольной интоксикации у оригинального антиконвульсанта, действующего на молекулярные мишени влияния этанола в ЦНС и иммунной системе, целью проведенного исследования было оценить центральные эффекты периферически введенных лимфоцитов с модулированной *in vitro* функциональной активностью синтетическим лигандом ГАМКА-рецепторного комплекса *мета*-хлорбензгидрилмочевинной у длительно алкоголизированных животных. В результате проведенных исследований установлено, что трансплантацией прекультивированных с указанным антиконвульсантом лимфоцитов у сингенных длительно алкоголизированных реципиентов достигается снижение алкогольной мотивации и стимуляция поведенческой активности в тесте «Открытое поле». Редактирование характерных для хронической алкогольной интоксикации паттернов поведения регистрировалось на фоне снижения в патогенетически значимых структурах мозга провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α , ИФН- γ и повышения противовоспалительного цитокина ИЛ-10, равно как и повышения уровня BDNF в гиппокампе, что позволяет рассматривать снижение нейровоспаления и стимуляцию нейропластичности в качестве возможных механизмов редактирования поведения реципиентов. Визуализация функционально активных лимфоцитов, прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной в паренхиме головного мозга длительно алкоголизированных реципиентов предполагает также непосредственное влияние введенных лимфоцитов на клетки ЦНС. Таким образом, модулированные *in vitro* *мета*-хлорбензгидрилмочевинной иммунокомпетентные клетки посредством относительно независимых механизмов оказывают позитивное психонейромодулирующее влияние при хронической интоксикации этанолом, что позволяет рассматривать адоптивную иммунотерапию в качестве возможного перспективного метода в лечении алкоголизма.

Ключевые слова: алкоголизм, *мета*-хлорбензгидрилмочевина, лимфоциты, головной мозг, поведение, цитокины, нейротрофический фактор мозга

DOI: 10.31857/S1027813323030123, **EDN:** YVAMDK

ВВЕДЕНИЕ

Представления о патогенезе алкоголизма претерпели определенную эволюцию в связи с достижениями в области наркологии, биохимии, нейробиологии и молекулярной биологии; к настоящему времени сформирована концепция о прин-

ципальном единстве стержневых механизмов формирования зависимости от психоактивных веществ [1]. По современным представлениям существенным звеном в патогенезе алкоголизма является нарушение обеспечивающих поддержание динамического гомеостаза нейроиммунных интегративных связей, характеризующееся дисбалансом нейромедиаторов и нейромодуляторов в ЦНС, усиленной продукцией аутоантител к нейромедиаторам, нарушением центральной и периферической

* Адресат для корреспонденции: 630099 Россия, Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14, e-mail: evgeniya_markova@mail.ru.

продукции цитокинов, эффекты которых опосредуются клеточными элементами нервной и иммунной систем [2–7].

Хроническая интоксикация этанолом вызывает развитие толерантности и зависимости, посредством взаимодействия этанола с ГАМКА/бензодиазепиновым рецепторным комплексом (ГАМКА/БДР) в различных структурах головного мозга. ГАМКА-рецепторы (ГАМКА-Р), представляют основную ингибиторную нейротрансмиттерную систему в ЦНС и играют центральную роль в опосредовании эффектов этанола [2, 7–9]. Описано также наличие функциональных ГАМКА-Р на поверхности иммунокомпетентных клеток, в частности, Т-лимфоцитов. Изменение активности ГАМКА-Р, аналогично эффектам на нейрональных клетках, вызывает модуляцию функциональной активности клеток иммунной системы дозозависимым образом [10, 11]. Хроническая интоксикация этанолом приводит к изменению функционального фенотипа периферических иммунокомпетентных клеток, снижает эффективность клеточного и гуморального иммунного ответа на инфекцию и вакцинацию, что может быть связано, в частности, с конверсией фенотипа наивных Т-лимфоцитов, с сокращением числа CD4 и CD8 субпопуляций лимфоцитов и модуляцией их функциональной активности. [12–14]. Показано также увеличение митоген-индуцированной продукции иммунокомпетентными клетками провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО- α [3, 5, 7, 14–16]; переход к провоспалительному ответу происходит посредством повышения фосфорилирования р65 субъединицы NF κ B, стимуляции транслокации NF κ B в ядро и большей продукции провоспалительных цитокинов [2, 19]. Механизмы воздействия этанола на иммунную систему также могут быть реализованы через изменение активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, которая, в свою очередь, находится под регулирующим влиянием цитокинов как периферического, так и центрального происхождения [8, 9, 17]. Обращает на себя внимание установленный факт того, что при хронической интоксикации этанолом, лимфоциты приобретают способность поддерживать/усиливать алкогольную мотивацию [18].

Мишенями действия этанола являются также бензодиазепиновые рецепторы (БДР). Бензодиазепины, связываясь со специфическими местами на ГАМКА-Р комплексе – бензодиазепиновыми рецепторами, изменяют его конформацию и аффинитет, аллостерически модулируя его функцию, потенцируя процессы торможения в структурах мозга, влияющих на активность разных нейромедиаторных систем. Хроническое употребление алкоголя вызывает нейроадаптивные изменения БДР, модулирующих ГАМКА-Р, что поддерживает алкогольную аддикцию [19]. В этой связи, приме-

нение искусственных лигандов БДР, оказывающих модулирующее действие на ГАМКА/БДР, стимулирующих ГАМК-медиацию, проявляющих иммуномодулирующие свойства, может обеспечить новый патогенетический подход к терапии алкоголизма. Оригинальный антиконвульсант, соединение *мета*-хлорбензгидрилмочевина, как установлено, повышает нейромедиацию ГАМК в мозге, обладая модулирующим действием на нейрональные рецепторы, в частности ГАМКА/БД-рецепторную систему [19, 20]. Наличие функциональных ГАМКА-Р на поверхности клеток иммунной системы, в частности, лимфоцитов обуславливает также выявленные нами ранее иммуномодулирующие свойства *мета*-хлорбензгидрилмочевины, определяемые состоянием организма; в частности, при хронической интоксикации этанолом указанное соединение условиях *in vitro* ГАМКА-Р-опосредованным образом снижает повышенную пролиферативную активность лимфоцитов и повышает их сниженную чувствительность к Т-клеточному митогену практически до уровня, характерного для лимфоцитов интактных животных [21, 21], что обуславливает позитивный психонейроиммуномодулирующий эффект соединения при хронической интоксикации этанолом при внутрижелудочном введении [23, 24]. Однонаправленное влияние большинства психоактивных препаратов на ЦНС и иммунную систему позволяет рассматривать иммунокомпетентные клетки в качестве модельных объектов для воздействия на межсистемную функциональную взаимосвязь и позволяет считать перспективным исследование возможности применения метода адоптивной иммунотерапии для ослабления характерной для хронического алкоголизма симптоматики. Весомым аргументом в пользу этого служат результаты экспериментальных иммунонейробиологических исследований, продемонстрировавших торможение усиленного потребления этанола алкоголизированными мышами после адоптивного переноса им спленоцитов, инкубированных *in vitro* с антителами к серотонину [18]. В лаборатории нейроиммунологии НИИФКИ также ранее было показано позитивное психонейроиммуномодулирующее влияние адоптивного переноса иммунокомпетентных клеток при поведенческих расстройствах, в том числе и индуцированных хронической интоксикацией психоактивным веществом [25–28]. 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 [29–32]. Принимая во внимание тот факт, что одним из патогенетических механизмов хронической алкогольной интоксикации является изменение функциональной активности иммунных клеток и приобретение лимфоцитами способности переносить алкогольную

мотивацию [18], подтвержденной и в собственных исследованиях (данные не приводятся), методом выбора в лечении алкоголизма, может стать иммунотерапия аутологичными лимфоцитами с экстракорпорально модулированной лигандом ГАМКА-Р функциональной активностью.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования было оценить центральные эффекты периферически введенных лимфоцитов с модулированной *in vitro* функциональной активностью синтетическим лигандом ГАМКА-Р *мета*-хлорбензгидрилмочевинной у длительно алкоголизированных животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные и модель хронической алкогольной интоксикации. Исследование выполнено на мышах-самцах (СВА × C57BL/6)F1 9.5–10-месячного возраста, полученных в возрасте 3-х месяцев из питомника НИЛЭМ (г. Томск). Животных содержали в условиях лабораторного вивария в клетках по 5–10 особей в каждой, на стандартной диете, при естественном световом режиме. Исследования с животными проводились в соответствии с законодательством Российской Федерации, положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. 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 НИ-ИФКИ (протокол заседания № 139 от 30.05.2022 г.).

Учитывая наличие в популяции самцов (СВА × C57BL/6)F1 особей с активным и пассивным типами поведения, различающимися по уровню потребления этанола [23, 24], с целью формирования однородных групп экспериментальных животных все мыши были предварительно протестированы в “открытом поле”, и в исследование были включены только особи со средним уровнем ориентировочно-исследовательского поведения (ОИП). Для моделирования хронической алкогольной интоксикации использовали метод принудительного спаивания, при котором мыши были вынуждены употреблять 10% раствор этанола в качестве единственного источника жидкости на протяжении 6 месяцев. Формирование зависимости от этанола оценивалось путем однократной инъекции налоксона (3 мг/кг, подкожно) с последующей визуальной регистрацией признаков “синдрома отмены” (корчи, судороги, скрежет зубами, отряхивания “мокрой собаки”, птоз, диарея).

Вещество. В качестве модулятора функциональной активности лимфоцитов длительно алкоголизированных мышей *in vitro* использовалось оригинальное соединение, *мета*-хлорбензгидрил-

мочевина, являющееся синтетическим лигандом ГАМКА-Р, нециклическим аналогом фенобарбитуратов с выявленными противосудорожными и иммуномодулирующими свойствами [19–24]. Соединение синтезировано в проблемной научно-исследовательской лаборатории синтеза лекарственных средств Национального исследовательского Томского политехнического университета в процессе поиска высокоэффективных антиконвульсантов.

Подготовка и трансплантация лимфоцитов. В качестве доноров и реципиентов иммунокомпетентных клеток использовались длительно алкоголизированные мыши-самцы (СВА × C57BL/6)F1. Животных-доноров забивали путем цервикальной дислокации; в стерильных условиях вскрывали брюшную полость, извлекали селезенку, очищали от соединительной ткани и помещали во флаконы с охлажденной до 40°C средой RPMI-1640 (5 мл на селезенку). Выделение селезеночных лимфоцитов производили путем перфузии селезенки с последующим удалением эритроцитов методом гемолитического шока и макрофагальной фракции спленоцитов адгезией на пластике в течение двух часов при температуре 37°C. Полученная суспензия на 88–93% состояла из лимфоидных клеток. Жизнеспособность клеток оценивалась по включению трипанового синего и составляла 93–95%. Далее селезеночные лимфоциты ресуспензировали в неполной среде RPMI-1640 (Sigma) и подвергали *in vitro* инкубации с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной в концентрации 10 мкг/мл течение 30 мин. Затем производили трехкратную отмывку лимфоцитов от соединения в физиологическом растворе и ресуспензировали клетки в среде RPMI-1640. Прекультивированные с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной лимфоциты вводили внутривенно сингенным длительно алкоголизированным реципиентам (15×10^6 клеток на одно животное). В качестве отрицательного контроля использовали длительно алкоголизированных мышей и сингенных реципиентов, которым были введены лимфоциты, прекультивированные в аналогичных условиях эксперимента, но в отсутствии *мета*-хлорбензгидрилмочевинной. В качестве положительного контроля использовали интактных животных соответствующего возраста.

Поведенческое тестирование. Алкогольную мотивацию оценивали по потреблению 10% раствора этанола в условиях свободного выбора с водой (двух-бутылочный оральный тест). Потребление 10% раствора этанола и воды длительно алкоголизированными мышами-реципиентами регистрировалось ежедневно в 10 ч утра в течение 7 дней, начиная с первого дня после клеточной трансплантации. Для этого в каждой клетке находились две поилки (с водой и 10% раствором этанола) для того, чтобы мыши могли потреблять жидкости в зависимости от индивидуальной потребности. Контрольные животные (длительно алкоголизированные и

интактные) находились в аналогичных условиях эксперимента.

ОИП животных оценивали в тесте “Открытое поле” [33], для этого использовалась стандартная установка, которая представляет собой камеру размером 100×100 см, с высокими бортами (40 см). Пол установки расчерчен на равные сектора (10×10 см), предназначенные для визуальной регистрации двигательной активности экспериментальных животных. Освещение осуществлялось с помощью бестеневой лампы мощностью 100 Вт, которая расположена над центром поля на высоте 100 см. Животное помещалось в угол камеры, и регистрировалась его моторная и исследовательская активность в течение 5 мин с интервалом в 1 мин. Для оценки исследовательской активности подсчитывалось количество вертикальных стоек (свободных и пристеночных — с опорой на борт камеры); для оценки моторной активности — количество пересеченных центральных и периферических квадратов поля. Эмоциональная реактивность определялась по количеству фекальных болюсов. Все эксперименты проводились в период с 10 до 14 ч.

Определение уровня цитокинов в головном мозге. Количественное содержание цитокинов определяли в лизатах патогенетически значимых структур головного мозга сингенных длительно алкоголизованных реципиентов иммунокомпетентных клеток (гиппокамп, гипоталамус, стриатум, фронтальная кора). Лизаты указанных структур головного мозга получали путем гомогенизирования тканей в среде RPMI-1640 с добавлением 0.1% Triton X-100 (GERBU Biotechnik GmbH), с последующим центрифугированием в течение 3 мин при 10000 об./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. Результаты представлены в виде массовой концентрации (пг) на мг ткани.

Определение количественного содержания нейротрофического фактора в головном мозге. Количественное содержание нейротрофического фактора BDNF в головном мозге сингенных длительно алкоголизованных реципиентов определяли в супернатантах лизатов отдельных структур мозга, для которых показана наиболее выраженная экспрессия фактора (гиппокамп, фронтальная кора) методом ИФА (ELISA) с использованием специ-

фической тест-системы “R&D Systems Inc.” (USA) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Выделение и проточная цитофлуориметрия лимфоцитов головного мозга. Для выявления введенных внутривенно лимфоцитов в ткани головного мозга сингенных длительно алкоголизованных реципиентов была проведена прижизненная окраска прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной лимфоцитов витальным красителем CFSE (Invitrogen, USA) по методике фирмы-производителя. Длительно алкоголизованных реципиентов забивали путем цервикальной дислокации на 3 сутки после трансплантации лимфоцитов с последующим выделением головного мозга. Клеточную суспензию ткани головного мозга перед проведением цитометрического исследования разделяли на трехступенчатом градиенте перколла (Sigma) по описанной методике для обогащения образцов лимфоцитарной фракцией [34]. Цитометрический анализ проводили с помощью проточного цитофлуориметра “BD FACSVerser” и программного обеспечения “BD FACSuite”.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ SPSS 11.0. При анализе количественных данных проверку на нормальность распределения фактических данных проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для каждой из непрерывных величин определяли среднее (M) и стандартное отклонение (SD). 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. Для множественного сравнения показателей использовали критерий Крускала–Уоллиса. 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 И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе проведенного исследования установлено, что внутривенное введение сингенных лимфоцитов, прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной, снижает алкогольную мотивацию у длительно алкоголизованных сингенных реципиентов, на что указывает снижение потребления указанными животными 10% раствора этанола в условиях свободного выбора с водой (рис. 1). В течение 7 дней тестирования среднесуточное потребление раствора этанола в группе контрольных интактных животных аналогичного возраста составило 0.6 ± 0.6 мл/день/мышь; в группе

контрольных длительно алкоголизованных животных — 6.9 ± 1.1 мл/день/мышь ($p < 0.01$); в группах длительно алкоголизованных реципиентов среднесуточное потребление этанола составило: после внутривенного введения сингенных лимфоцитов, прекультивированных без *мета*-хлорбензгидрилмочевины (Реципиенты 1) — 6.7 ± 2.7 мл/день/мышь ($p > 0.05$ по сравнению с контрольными длительно алкоголизованными мышами; $p < 0.01$ по сравнению с контрольными интактными мышами); после внутривенного введения сингенных лимфоцитов, прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевиной (Реципиенты 2) — 2.4 ± 1.5 мл/день/мышь ($p < 0.05$ по сравнению с контрольными группами длительно алкоголизованных мышей, интактных мышей и группы “Реципиенты 1”).

Анализ поведения в “открытом поле” длительно алкоголизованных реципиентов сингенных лимфоцитов, прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевиной, выявил повышение двигательной активности как в периферических, так и в центральных квадратах поля, а также манежного бега (повышение количества стоек с опорой на стенку поля), что свидетельствует о стимуляции ОИП (табл. 1). Обращает на себя внимание тот факт, что после трансплантации прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевиной лимфоцитов у сингенных длительно алкоголизованных реципиентов наиболее выраженный эффект наблюдался в отношении стимуляции моторного компонента поведения, при этом не было выявлено существенного изменения эмоциональной реактивности реципиентов, оцененной по числу фекальных болюсов (данные не приводятся). Достоверных различий как в количестве потребляемого раствора этанола, так и в параметрах ОИП у реципиентов после трансплантации прекультивированных в отсутствие *мета*-хлорбензгидрилмочевины иммунокомпетентных клеток по сравнению с контрольной группой длительно алкоголизованных мышей не выявлено, что свидетельствует в пользу того, что именно рецептор-опосредованное взаимодействие *мета*-хлорбензгидрилмочевины с ГАМКА-рецепторным комплексом лимфоцитов длительно алкоголизованных мышей, путем выявленной нами ранее модуляции функциональной активности клеток [21], обуславливает продемонстрированный эффект редактирования периферически введенными иммунокомпетентными клетками характерных для хронической интоксикации этанолом поведенческих паттернов.

Хроническая интоксикация этанолом, как известно, приводит к нейровоспалению и нейродегенерации [2, 3, 4, 7, 35–37]. Нейровоспаление, характерное для хронического алкоголизма, обусловлено как прямым взаимодействием этанола с нейрональными и иммунными клетками мозга, так и с индукцией воспаления на периферии. Так,

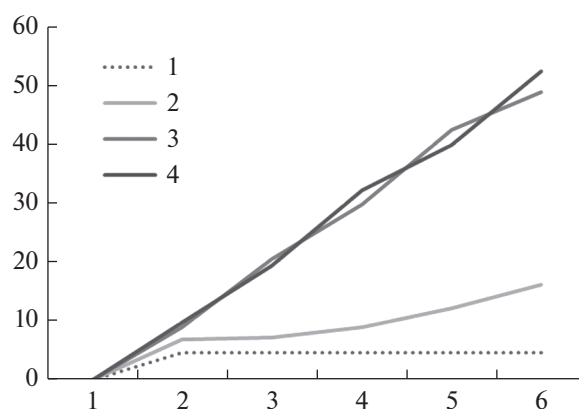


Рис. 1. Накопительное потребление 10% раствора этанола длительно алкоголизованными самцами (СВА × С57BL/6)F1 после внутривенного введения сингенных лимфоцитов, модулированных *in vitro* *мета*-хлорбензгидрилмочевиной. Примечания: Представлено среднесуточное потребление этанола (мл/мышь), начиная с 1-го дня после внутривенного введения лимфоцитов в условиях свободного выбора с водой. 1 — интактные животные. 2 — длительно алкоголизованные реципиенты после введения сингенных лимфоцитов, прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевиной (Реципиенты 2). 3 — длительно алкоголизованные реципиенты после введения сингенных лимфоцитов, прекультивированных без *мета*-хлорбензгидрилмочевины (Реципиенты 1). 4 — длительно алкоголизованные животные.

потребление этанола вызывает продолжительную активацию микроглии преимущественно в гиппокампе, опосредованную Toll-like рецепторами (TLRs) [3, 5, 7, 38, 39]. Выявлен также альтернативный путь активации TLR-4, опосредованный ГАМКА-рецепторами, являющимися основной мишенью действия этанола [40]. Хроническое воздействие этанола приводит к усиленной продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО- α , ИФН- γ и повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера [4, 5, 7, 15, 16, 37, 38]. Периферические цитокины, продуцируемые иммунокомпетентными клетками, проникая через гематоэнцефалический барьер, также оказывают модулирующее влияние на цитокиновую сеть мозга, а затем, посредством влияния на нейроэндокринные функции, нейротрансмиттерные системы и нейрональную активность вовлекаются в патофизиологические механизмы алкоголизма.

При исследовании количественного содержания патогенетически значимых цитокинов в отдельных структурах головного мозга длительно алкоголизованных реципиентов после трансплантации сингенных лимфоцитов, прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевиной, было зарегистрировано снижение провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α в гипоталамусе, стриатуме и фронтальной коре, а также ИФН- γ в

Таблица 1. Показатели поведения в тесте “открытое поле” длительно алкоголизованных самцов (СВА × С57BL/6)F1 после внутривенного введения сингенных лимфоцитов, модулированных *in vitro* *мета*-хлорбензгидрилмочевинной

Группа	Горизонтальная двигательная активность			Вертикальная двигательная активность		
	периферическая	центральная	суммарная	свободная	с опорой на стенку	суммарная
Интактные животные	45.2 ± 4.5	7.0 ± 0.4	52.2 ± 4.9	1.3 ± 0.2	3.8 ± 0.3	5.1 ± 0.5
Длительно алкоголизованные животные	11.3 ± 1.5**	0**	11.3 ± 1.5**	0**	0**	0**
Реципиенты 1	15.9 ± 3.7**	0**	15.9 ± 3.7**	0**	0**	0**
Реципиенты 2	42.8 ± 3.7#	5.3 ± 0.7#*	48.1 ± 4.4#*	0**	2.6 ± 0.4*#	2.6 ± 0.4#*

Примечания: Реципиенты 1 — длительно алкоголизованные реципиенты после трансплантации сингенных спленоцитов, прекультивированных без *мета*-хлорбензгидрилмочевины. Реципиенты 2 — длительно алкоголизованные реципиенты после трансплантации сингенных спленоцитов, прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной. Тестирование проводилось на 3 сутки после трансплантации клеток. Результаты представлены в виде $M \pm SD$; $n = 22-25$ в каждой группе; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с интактными животными; # $p < 0.01$ по сравнению с длительно алкоголизованными животными.

гипоталамусе, стриатуме и гиппокампе; при этом выявлено повышение противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в гипоталамусе и гиппокампе (рис. 2), что указывает на снижение нейровоспаления. Исследования с использованием животных моделей показали, что нейровоспаление способствует поддержанию алкогольной зависимости [3, 7, 41]. Провоспалительные цитокины, являются также триггерами депрессивно-подобного поведения при алкоголизме, в том числе и путем модуляции активности ГАМКА-Р в нейронах коры, гиппокампа и стриатума. В силу чего, установленная в настоящем исследовании модуляция цитокинового фона в этих структурах головного мозга может являться одним из механизмов продемонстрированной выше стимуляции двигательной активности длительно алкоголизованных реципиентов модулированных оригинальным антиконвульсантом иммунокомпетентных клеток.

Существует мнение о том, что при хроническом алкоголизме нейровоспаление ассоциировано со снижением уровня мозгового нейротрофического фактора BDNF, вызывающего не только нарушения нейропластичности, но и являющегося причиной перехода от случайного употребления алкоголя к компульсивному [7, 41–43]. BDNF, белок из класса цитокинов, семейства факторов роста и подсемейства нейротрофинов; выявляющийся в глиальных и преимущественно в нейрональных клетках, является одним из факторов, поддерживающих дифференциацию, созревание

и выживаемость нейронов в нервной системе, угнетающих клеточный апоптоз и проявляющих нейропротекторный эффект в неблагоприятных условиях; при хронической интоксикации этанолом наблюдается неадаптивная пластичность, обусловленная снижением уровня BDNF [44, 45]. Вышеизложенное послужило основанием для исследования содержания BDNF в патогенетически значимых структурах головного мозга у длительно алкоголизованных реципиентов после трансплантации сингенных лимфоцитов с модулированной *мета*-хлорбензгидрилмочевинной функциональной активностью. Наиболее выраженная экспрессия BDNF показана в гиппокампе и фронтальной коре [45], где и было определено его количественное содержание.

В результате проведенных исследований установлено, что хроническая интоксикация этанолом привела, как и ожидалось, к снижению уровня BDNF в обеих исследованных структурах головного мозга; при этом наиболее выраженное снижение нейротрофического фактора регистрировалось в гиппокампе. После трансплантации модулированных *in vitro* оригинальным антиконвульсантом лимфоцитов у сингенных длительно алкоголизованных реципиентов регистрировалось повышение количественного содержания BDNF в гиппокампе (табл. 2), свидетельствующее о стимуляции процессов нейропластичности. Принимая во внимание тот факт, что BDNF может выступать в качестве эндогенного отрицательного ре-

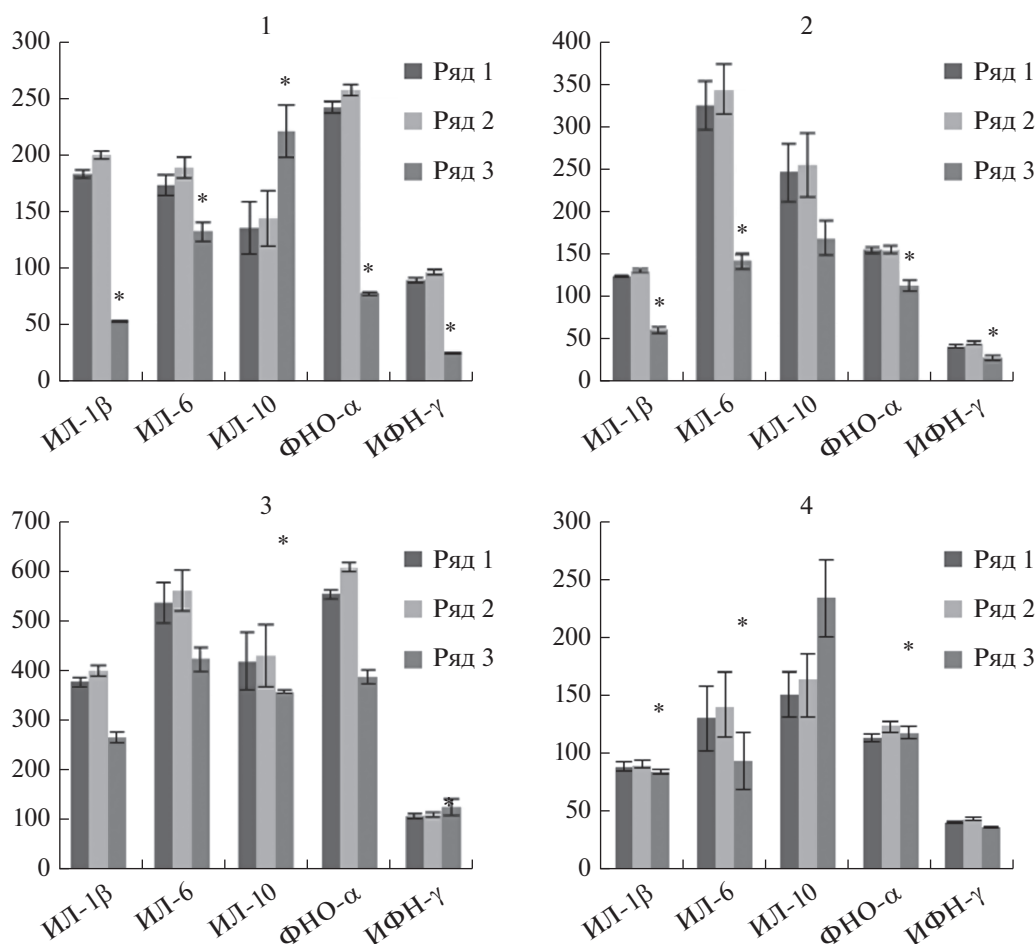


Рис. 2. Содержание цитокинов (пг/мл) в структурах головного мозга длительно алкоголизованных реципиентов (CBA × C57BL/6)F1 после внутривенного введения сингенных лимфоцитов, модулированных *in vitro* *meta*-хлорбензгидрилмочевиной. Примечания: 1 – гипоталамус; 2 – стриатум; 3 – гиппокамп; 4 – фронтальная кора. Ряд 1 – образцы супернатантов лизатов соответствующей структуры головного мозга длительно алкоголизованных животных. Ряд 2 – образцы супернатантов лизатов соответствующей структуры головного мозга длительно алкоголизованных реципиентов после введения сингенных лимфоцитов, прекультивированных без *meta*-хлорбензгидрилмочевины (Реципиенты 1). Ряд 3 – образцы супернатантов лизатов соответствующей структуры головного мозга длительно алкоголизованных реципиентов после введения сингенных лимфоцитов, прекультивированных с *meta*-хлорбензгидрилмочевиной (Реципиенты 2). Результаты представлены в виде $M \pm SD$; $n = 10$ в каждой группе; * $p < 0.05$ между соответствующими показателями в группах реципиентов клеток.

гулятора потребления этанола и рассматривается как потенциальный фактор устойчивости к немотивированному употреблению алкоголя [44], логично предположить, что повышение уровня BDNF и нейропластичности в гиппокампе является одним из механизмов продемонстрированного эффекта лимфоцитов, модулированных *meta*-хлорбензгидрилмочевиной, направленного на снижение алкогольной мотивации у длительно алкоголизованных реципиентов иммунокомпетентных клеток.

Имеются также данные о том, что не только цитокины, но и иммунокомпетентные клетки могут проникать в головной мозг и изменять функциональное состояние ЦНС, включая редактирование поведения, путем непосредственного контакта

с клетками головного мозга [34–37]. Обусловленная нейровоспалением повышенная проницаемость гематоэнцефалического барьера при хронической алкогольной интоксикации предполагает и этот механизм реализации выявленных центральных эффектов трансплантированных лимфоцитов. Подтверждением чему служит визуализация функционально активных лимфоцитов, прекультивированных с *meta*-хлорбензгидрилмочевиной в паренхиме головного мозга длительно алкоголизованных реципиентов (рис. 3). Доля меченных лимфоцитов, зафиксированная в мозге реципиентов, составляет примерно 0.5% от общего числа лимфоцитов головного мозга, причем на момент тестирования (3 сутки после системного введения клеток) регистрируются, как минимум,

Таблица 2. Содержание BDNF (пг/мл) в структурах головного мозга длительно алкоголизированных самцов (CBA × C57BL/6)F1 после трансплантации сингенных лимфоцитов, модулированных *in vitro* мета-хлорбензгидрилмочевинной

Структура мозга	Интактные животные	Длительно алкоголизированные животные	Реципиенты 1	Реципиенты 2
Фронтальная кора	112.1 ± 11.3	93.9 ± 5.4*	91.7 ± 6.9*	90.7 ± 7.8*
Гиппокамп	115.9 ± 9.1	83.9 ± 7.2*	86.4 ± 9.3*	113.4 ± 6.2≠

Примечания: Реципиенты 1 – длительно алкоголизированные реципиенты после трансплантации сингенных спленоцитов, прекультивированных без мета-хлорбензгидрилмочевины. Реципиенты 2 – длительно алкоголизированные реципиенты после трансплантации сингенных спленоцитов, прекультивированных с мета-хлорбензгидрилмочевинной. Результаты представлены в виде $M \pm SD$. $n = 6$ в каждой группе; * $p < 0.05$ по сравнению с интактными животными; ≠ $p < 0.05$ по сравнению с длительно алкоголизированными животными и группой “Реципиенты 1”.

две четко выраженных генерации лимфоцитов (рис. 3, цитограмма б), свидетельствующие об их выраженной пролиферативной активности, что убедительно свидетельствует о том, что введенные иммунокомпетентные клетки в мозге функционально активны и показанные выше центральные эффекты могут быть, в том числе, и результатом непосредственного влияния модулированных мета-хлорбензгидрилмочевинной лимфоцитов на ЦНС.

Следовательно, анализ данных литературы в совокупности с результатами собственных исследований, позволяет рассматривать существование комплекса относительно независимых механизмов реализации выявленных в исследовании центральных эффектов системно введенных иммунокомпетентных клеток с измененной *ex vivo* оригинальным

антиконвульсантом функциональной активностью у сингенных длительно алкоголизированных реципиентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, модулированные *in vitro* оригинальным антиконвульсантом мета-хлорбензгидрилмочевинной иммунокомпетентные клетки после внутривенного введения длительно алкоголизированным сингенным реципиентам оказывают позитивный психонейромодулирующий эффект, проявляющийся в редактировании характерных для хронической интоксикации этанолом паттернов поведения на фоне снижения нейровоспаления и стимуляции нейропластичности, что служит экс-

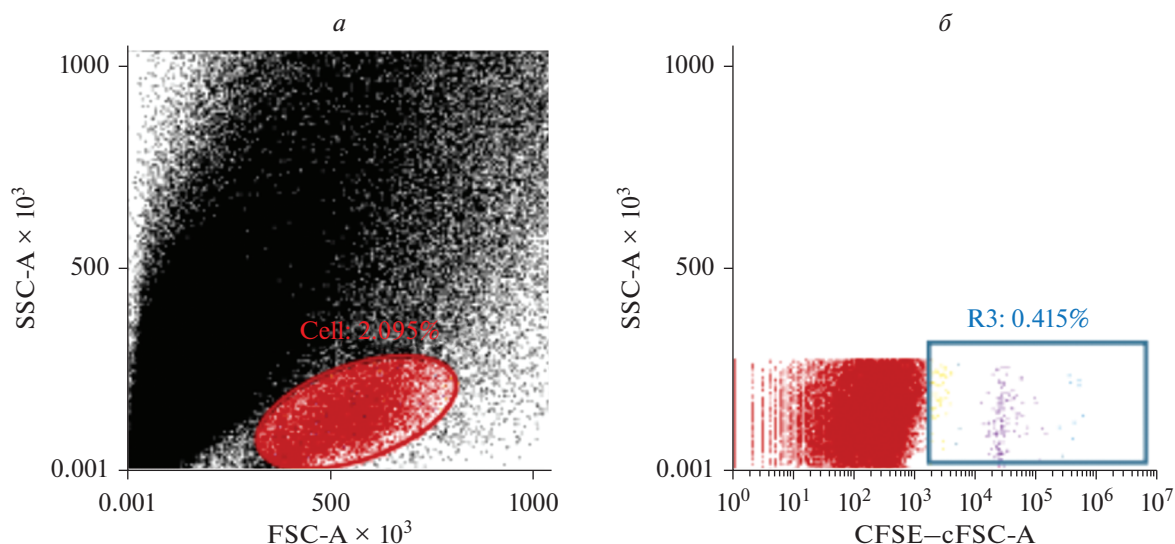


Рис. 3. Цитограмма лимфоцитарной фракции клеток головного мозга длительно алкоголизированных реципиентов (CBA × C57BL/6)F1 после внутривенного введения меченных CFSE сингенных лимфоцитов, модулированных *in vitro* мета-хлорбензгидрилмочевинной. Примечания: а – диаграмма фронтального-бокового рассеяния, [cell] – область имфоцитарного облака. б – диаграмма бокового рассеяния против CFSE, гейтирована по области [cell] цитограммы а, предназначена для выявления относительного содержания меченных CFSE лимфоцитов от общего числа лимфоцитов.

периментальным обоснованием разработки новых подходов к терапии алкоголизма с использованием клеточных технологий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарность старшему научному сотруднику Томского национального исследовательского медицинского центра РАН к.м.н., Шушпановой Т.В. за предоставление соединения мета-хлорбензгидрилмочевина для исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований по теме № 122011800324-4 (2021-2023) “Обоснование и разработка новых технологий иммуномодуляции, стимуляции репаративных процессов и коррекции поведенческих и аддиктивных расстройств на основе использования миелоидных, лимфоидных и стволовых клеток и/или продуктов их секрета”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Этическое одобрение. Исследования с животными проводились в соответствии с законодательством Российской Федерации, положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22.09. 2010 г. 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.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анохина И.П. // Вопросы наркологии. 2018. № 2. С. 22–34.
2. Ward R.J., Lallemand F., De Witte P. // Alcohol & Alcoholism. 2009. V. 44 (2). P. 128–135.
3. Kelley K.W., Dantzer R. // Brain. Behav. Immun. 2011. V. 25 (S1). P. S13–S20.
4. Crews F.T., Lawrimore C.J., Walter T.J., Coleman L.G. // Neuropharmacol. 2017. V. 122. P. 56–73.
5. Meredith L.R., Burnette E.M., Grodin E.N., Irwin M.R., Ray L.A. // Brain. Behav. Immun. 2021. V. 97. P. 349–364.
6. Blaine S.K., Sinha R. // Neuropharmacol. 2017. V. 122. P. 136–147.
7. Pérez-Reytor D., Karahanian E. // The American Journal of Drug and Alcohol Abuse. 2022. <https://doi.org/10.1080/00952990.2022.2114005>
8. Follesa P., Floris G., Asuni G.P., Ibba A., Tocco M.G., Zicca L., Gorini G. // Front. in Cell. Neurosci. 2015. V. 9. P. 445.
9. Centanni S.W., Teppen T., Risher M., Fleming, R.L., Moss J.L., Acheson S.K. et al. // Alcohol. Clin. Exp. Res. 2014. V. 38. P. 2800–2808.
10. Alam S., Walding A // Mol. Immunol. 2006. V. 43. № 9. P. 1432–1442.
11. Mendu S.K., Akesson L., Jin Z., Edlund A., Cilio C., Lernmark A., Birnir B. // Mol. Immunol. 2011. V. 48. № 4. P. 399–407.
12. Zhang H., Meadows G.G. // J. Leukocyte Biol. 2005. V. 78. № 5. P. 1070–1080.
13. Zuluaga P., Sanvisens A., Caceres E.M., Muga R. // Drug and Alcohol Dependence. 2017. V. 180. P. 7–13.
14. Sureshchandra S., Raus A., Jankeel A., Ligh B.J.K., Walter N.A., Newman N., Messaoudi I. // Scientific Reports. 2019. V. 9. № 1. P. 1–13.
15. Pang M., Bala S., Kodys K., Catalano D., Szabo G. // BMC Immunology. 2011. V. 12. № 1. P. 1–11.
16. Crews F.T., Sarkar D.K., Qin L., Zou J., Boyadjieva N., Vetreno R.P. // Alcohol Res. 2015. V. 37. P. 331–351.
17. Boyd K.N., Kumar S., O’Buckley T.K. // J. Neurochem. 2010. V. 112. № 3. P. 784–796.
18. Evseev V.A., Davydova T.V., Mikovskaya O.I. // Bull. Exp. Biol. Med. 2001. V. 131. № 4. P. 364–368.
19. Shushpanova T.V., Solonsky A.V., Bokhan N.A., Novozheeva T.P., Udut V.V., Arbit G.A., Filimonov V.D. // J. Alcohol Drug Depend. 2016. V. 4. № 234. P. 2.
20. Novozheeva T., Markova E., Shushpanova O., Knyazeva E., Shushpanova T. // European Psychiatry. 2019. V. 56. P. S15.
21. Маркова Е.В., Савкин И.В., Шушпанова Т.В., Князева М.А., Аникеева О.С. // Изобретения и полезные модели. Официальный бюллетень федеральной службы по интеллектуальной собственности. 2019. № 17. RU 2691143 C1.
22. Markova E., Savkin I., Anikeeva O., Shushpanova T. // European Psychiatry. 2019. V. 56(S). P. 662–663.
23. Markova E., Knyazheva M., Savkin I., Shushpanova T. // European Psychiatry. 2017. V. 41(S1). P. 742–743.
24. Markova E.V., Savkin I.V., Knyazheva M.A., Shushpanova T.V. // Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry. 2020. V. 1 (106). P. 14–22 (in Rus).
25. Markova E., Starostina M., Abramov V., Kozlov V. // Proceedings of the 2nd European Congress of Immunology. Free Papers. Editors Reinhold E. Schmidt. MEDIMOND S.r.l., Bolonga, Italy. 2009. P. 423–429.
26. Markova E.V., Knyazheva M.A. // Medical Immunology (Russia). 2021. V. 23 (4). P. 699–704.
27. Markova E.V., Knyazheva M.A., Tikhonova M.A., Amsislavskaya T.G. // Neurosci. Lett. 2022. V. 786. P. 136790.
28. Markova E.V., Serenko E.V. // Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry. 2022. V. 3 (116). P. 5–13 (in Rus).
29. Rattazzi L., Piras G., Ono M., Deacon R., Pariente C.M., Acquisto F.D. // Transl. Psychiat. 2013. V. 3. P. 280.
30. Radjavi A., Smirnov I., Kipnis J. // Brain Behav. Immun. 2014. V. 35. P. 58–63.

31. Song C, Nicholson J.D., Clark S.M., Li X., Keegan A.D., Tonelli L.H. // *Brain Behav. Immun.* 2016. V. 57. P. 161–172.
32. Clark S.M., Vaughn C.N., Soroka J.A., Li Xi, Tonelli L.H. // *Eur. J. Neurosci.* 2018. V. 47. P. 968–978.
33. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. / Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М., 1991. 399 с.
34. Prasad S., Hu S., Sheng W.S., Singh A., Lokensgard J.R. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12. P. e0145457.
35. Crews F.T., Collins M.A., Dlugos C., Littleton J., Wilkins L., Neafsey E.J., Noronha A. // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 2004. V. 28. № 2. P. 350–364.
36. Topiwala, A., Allan, C.L., Valkanova, V., Zsoldos, E., Filippini, N., Sexton, C., Mahmood, A., Fooks, P., Singh-Manoux, A., Mackay, C.E., Kivimäki, M., Ebmeier, K.P. // *BMJ.* 2017. V. 357. P. j2353.
37. Lowe P.P., Morel C., Ambade A., Iracheta-Vellve A., Kwiatkowski E., Satishchandran A., Szabo G. // *J. Neuroinflammation.* 2020. V. 17. P. 1–18.
38. Flores-Bastías O., Karahanian E. // *Neuropharmacol.* 2018. V. 128. P. 401–407.
39. Airapetov M., Eresko S., Lebedev A., Bychkov E., Shabanov P. // *Biosci. Trends.* 2021. V. 15. № 2. P. 74–82.
40. Aurelian L., Balan I. // *Psychopharmacol.* 2019. V. 236. P. 3023–3043.
41. Logrip M.L., Barak S., Warnault V., Ron D. // *Brain Res.* 2015. V. 1628. P. 60–67.
42. Ceballos N., Sharma S. // *AIMS Neurosci.* 2016. V. 3. № 4. P. 398–432.
43. Peregud D.I., Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. // *J. Addict. Problems.* 2016. № 9–10. P. 29–41 (in Rus).
44. Feltenstein M.W., See R.E. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2013. V. 3. № 5. P. a011916.
45. Popova N.K., Ilchibaeva T.V., Antonov E.V., Pershina A.V., Bazovkina D.V., Naumenko V.S. // *Alcohol.* 2020. V. 87. P. 1–15.

Central Effects of Peripherally Introduced Immune Cells Modulated by an Original Anticonvulsant in Experimental Alcoholism

E. V. Markova^a, I. V. Savkin^a, E. V. Serenko^a, M. A. Knyazheva^a, and Yu. A. Shevchenko^a

^a Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology”, Novosibirsk, Russia

Violation of neuroimmune regulatory interrelation, caused, in particular, by a change in the immune cell's functional phenotype due to chronic ethanol intoxication, is an essential link in the pathogenesis of alcoholism. The unidirectional influence of most psychoactive drugs on the cells of the nervous and immune systems allows to consider immune cells as model objects for influencing intersystem functional interrelation. Based upon our own priority data on the presence of immunomodulatory properties in chronic alcohol intoxication at the original anticonvulsant acting on the molecular targets of ethanol influence in the central nervous system and the immune system, the aim of the present study was to evaluate the central effects of peripherally injected lymphocytes with *in vitro* modulated functional activity by a synthetic ligand of the GABAA-receptor complex *meta*-chlorobenzhydrylurea in long-term alcoholized animals. It was shown that transplantation of lymphocytes pre-cultivated with the anticonvulsant in syngeneic long-term alcoholic recipients achieves a decrease in alcohol motivation and stimulation of behavioral activity in the “open field” test. Editing of behavioral patterns characteristic for chronic alcohol intoxication was recorded against the background of a decrease in pathogenetically significant brain structures of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ and an increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10, as well as an increase in the level of BDNF in the hippocampus, which allows us to consider a decrease in neuroinflammation and stimulation neuroplasticity as possible mechanisms for editing the behavior of recipients. Visualization of functionally active lymphocytes pre-cultured with *meta*-chlorobenzhydrylurea in the brain's parenchyma of long-term alcoholized recipients also suggests a direct effect of injected lymphocytes on CNS cells. Thus, immune cells modulated *in vitro* with *meta*-chlorobenzhydrylurea by relatively independent mechanisms have positive psychoneuromodulating effects in chronic ethanol intoxication, which makes it possible to consider adoptive immunotherapy as a promising method in the treatment of alcoholism.

Keywords: alcoholism, *meta*-chlorobenzhydrylurea, lymphocytes, brain, behavior, cytokines, brain-derived neurotrophic factor