

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/281861360>

# [Effects of roncoleukin on immune parameters and mixed anxiety/depression state induced by chronic social defeat stress in male mice]

Article in *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova / Rossiiskaia akademiia nauk* · December 2014

CITATION

1

READS

38

7 authors, including:



[Anna Veniaminovna Shurlygina](#)

102 PUBLICATIONS 278 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[A.G. Galyamina](#)

Institute of Cytology and Genetics

46 PUBLICATIONS 275 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Natalia N Kudryavtseva](#)

Russian Academy of Sciences

262 PUBLICATIONS 3,741 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Whole transcriptome analysis of brain regions in animals with long experience of agonistic interactions [View project](#)

ОБЩАЯ И ИНТЕГРАТИВНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

**ВЛИЯНИЕ РОНКОЛЕЙКИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА  
И ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНОЕ СОСТОЯНИЕ,  
ВЫЗВАННЫЕ ХРОНИЧЕСКИМ СОЦИАЛЬНЫМ СТРЕССОМ  
У САМЦОВ МЫШЕЙ**

© А. В. Шурлыгина,<sup>1</sup> А. Г. Галямина,<sup>2</sup> Е. В. Мельникова,<sup>1</sup>  
Н. Г. Пантелеева,<sup>1</sup> М. В. Тендитник,<sup>1</sup> В. А. Труфакин,<sup>1</sup> Н. Н. Кудрявцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт физиологии СО РАМН, Новосибирск, Россия  
E-mail: anna\_v\_s@mail.ru

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия  
E-mail: galyamina@bionet.nsc.ru

Хронический социальный стресс ведет к развитию тревожно-депрессивного состояния у самцов мышей, которое сопровождается нарушением клеточного и гуморального иммунитета. Целью работы было исследовать влияние иммуностимулятора ронколейкина на различные звенья иммунитета и психоэмоциональное состояние депрессивных самцов мышей. Ронколейкин (5000 МЕ/кг, внутривнутрибрюшинно) и для сравнения физиологический раствор вводили тревожно-депрессивным самцам мышей в течение 2 недель на фоне относительного покоя. По окончании исследовали клеточный состав тимуса, селезенки и крови. Исследовалось также влияние препарата на коммуникативность, тревожность, депрессивность, оцениваемых в поведенческих тестах. Ронколейкин снизил количество тимоцитов и спленоцитов, но при этом произошло увеличение количества лейкоцитов в крови и повышение весового индекса тимуса. Под влиянием препарата увеличилось процентное содержание лимфоцитов CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> в тимусе, а также процентное содержание CD8<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>25<sup>-</sup> в селезенке. Был выявлен анксиогенный, стимулирующий и слабый антидепрессивный эффект. Ронколейкин малоэффективен в комплексном лечении нарушений иммунитета и психоэмоциональных расстройств, вызванных хроническим социальным стрессом.

*Ключевые слова:* иммунодефицит, тревожно-депрессивное расстройство, хронический социальный стресс, ронколейкин.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 100. № 2. С. 201—214. 2014

*A. V. Shurlygina,<sup>1</sup> A. G. Galyamina,<sup>2</sup> E. V. Melnikova,<sup>1</sup> N. G. Panteleeva,<sup>1</sup> M. V. Tenditnik,<sup>1</sup> V. A. Trufakin,<sup>1</sup> N. N. Kudryavtseva.<sup>2</sup> EFFECTS OF RONCOLEUKIN ON IMMUNE PARAMETERS AND MIXED ANXIETY/DEPRESSION STATE INDUCED BY CHRONIC SOCIAL DEFEAT STRESS IN MALE MICE. <sup>1</sup>Institute of Clinical and Experimental Lymphology SB RAMS, Novosibirsk, Russia, e-mail: anna\_v\_s@mail.ru; <sup>2</sup>Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: galyamina@bionet.nsc.ru.*

Chronic social defeat stress leads to the development of mixed anxiety-depression state, which accompanied by immune deficiency in male mice. Paper aimed to study effects of ronkole-

ukin on the parameters of cellular immunity in the thymus and spleen and psychoemotional state in these animals. METHODS. Mixed anxiety/depression state was produced by chronic social defeat stress during 20 days in male mice. Roncoleukin (5000 ME/kg, i/p) and saline were chronically injected to depressive mice during 2 weeks without agonistic interactions. After this period subpopulations of lymphocytes in the thymus and spleen were studied in male mice. The animals were also studied in behavioral tests estimating the levels of communicativeness, anxiety and depressiveness. RESULTS. Roncoleukin decreases the number of lymphocytes in the thymus and spleen, and increased the number of lymphocytes in blood and thymus index. Medication increased per cent of CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> lymphocytes in the thymus and per cent of CD8<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>25<sup>-</sup> lymphocytes in the spleen. Roncoleukin induced anxiogenic, stimulative and antidepressive effects. CONCLUSION. Roncoleukin has small efficacy for treatment of immune suppression induced by chronic social defeat stress and has anxiogenic, stimulating and weak antidepressive effects.

*Key words:* immune deficiency, mixed anxiety/depression disorder, chronic social stress.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 100. N 2. P. 201—214. 2014

Хронический социальный стресс, вызванный негативным опытом агонистических (конкурентных) взаимодействий, ведет к развитию выраженной тревоги, которая при длительном воздействии сопровождается развитием депрессивноподобного состояния у самцов мышей [обзоры<sup>1, 27</sup>]. Было показано, что у таких мышей наблюдаются признаки иммунной недостаточности: снижается вес тимуса, нарушается соотношение зрелых и незрелых тимоцитов, сопровождающееся снижением содержания Т-лимфоцитов, макрофагов и НК-клеток в селезенке с одновременным повышением процента В-клеток [10, 11], при этом снижается иммунный ответ на введение эритроцитов барана [18]. В тимусе уменьшалось число пролиферирующих клеток, а в селезенке, напротив, повышалось с одновременным снижением апоптоза [4]. Найдены изменения в соотношении форменных элементов крови и активности сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов [2]. Полученные данные свидетельствовали о том, что длительный социальный стресс приводит к развитию клеточного дисбаланса в иммунной системе со многими признаками снижения клеточного и гуморального иммунитета, а также общей резистентности [8].

Возник вопрос: можно ли, купируя негативное психоэмоциональное состояние, повлиять в позитивном русле и на показатели клеточного иммунитета? Оказалось, что хроническое введение анксиолитика диазепама на фоне социального стресса оказывало выраженный антитревожный эффект у самцов мышей [4] и предотвращало изменение иммунного статуса [11]. Хроническое введение антидепрессанта кломипрамина животным со смешанным тревожно-депрессивным расстройством оказало антидепрессивный эффект, но вызвало усиление тревожности [9]. При этом кломипрамин не привел к полной нормализации изменившегося под влиянием социального стресса субпопуляционного состава лимфоцитов в тимусе и селезенке [3]. В то же время в селезенке изменения клеточной пролиферации и апоптоза, возникшие при развитии тревожно-депрессивного состояния, под влиянием препарата полностью восстанавливались. Повышенный уровень содержания лейкоцитов в крови и весовой индекс тимуса, а также активность лактатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови у тревожно-депрессивных мышей после воздействия препаратом также приблизились к контрольному уровню [3]. Этот факт мог свидетельствовать о взаимосвязанности процессов развития психоэмоционального расстройства и снижения иммунитета, преимущественно его Т-клеточного звена. Чтобы доказать это, авторы попытались воздействовать на процессы пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов у тревожно-депрессивных мышей введением интерлейкина-2 в лечебных дозах и отследить при этом возможное влияние данного воздействия на психоэмо-

циональное состояние животных. Интерлейкин-2 был выбран исходя из того, что данный цитокин является Т-клеточным ростовым фактором, необходимым для центральной и периферической дифференцировки Т-лимфоцитов, т. е. воздействует на то звено иммунной системы, которое в наибольшей степени страдает при развитии тревожно-депрессивного состояния в используемой модели.

## МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на половозрелых самцах мышей линии C57BL/6J в возрасте 2.5—3 месяца, массой тела 26—28 г, которых разводили в стандартных условиях вивария Института цитологии и генетики СО РАН, пищу (гранулы) и воду животные получали в неограниченном количестве при световом режиме 12:12 ч. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)).

**Формирование тревожно-депрессивного состояния у самцов мышей под влиянием хронического социального стресса.** Тревожно-депрессивное состояние вызывали хроническим социальным стрессом, развивающемся при повторном опыте социальных поражений в ежедневных межсамцовых конфронтациях. Животных попарно помещали в экспериментальные клетки, разделенные пополам прозрачной перегородкой с отверстиями, позволявшей мышам видеть, слышать, воспринимать запахи друг друга (сенсорный контакт), но предотвращавшей физическое взаимодействие. Ежедневно во второй половине дня (с 15.00 до 17.00 ч) убирала перегородку, что приводило к агонистическим взаимодействиям. Во время первых 2—3 дней тестов выявляли победителей (агрессоров) и особей, терпящих поражения (побежденные самцы, жертвы) при взаимодействии с одним и тем же партнером. В дальнейшем ежедневно после теста побежденного самца пересаживали в новую клетку к незнакомому агрессивному партнеру, сидящему за перегородкой. Взаимодействие самцов прекращали, если интенсивные атаки со стороны нападающей особи во время агрессивных столкновений длились более 3 мин, вновь устанавливая между ними перегородку. В других ситуациях тест продолжался 10 минут. После 20 дней у самцов с повторным опытом социальных поражений развивалось тревожно-депрессивное состояние [27]. В качестве контроля использовали самцов, не имевших последовательного опыта агонистических взаимодействий [26].

**Фармакологическое воздействие.** Для коррекции иммунного статуса тревожно-депрессивных животных использовали рекомбинантный человеческий интерлейкин-2 (ронколейкин, «Биотех»), широко использующийся в клинической [5] и ветеринарной [7] практике для стимулирования иммунной системы с отслеживанием его возможного влияния на психоэмоциональное состояние.

На следующий день после 20 дней агонистических взаимодействий одной группе тревожно-депрессивных мышей начинали вводить физиологический раствор в течение 2 недель, другой группе вводили в аналогичном режиме ронколейкин (5000 МЕ/кг, внутривенно). Была использована доза препарата, указанная в инструкции по применению. В период фармакологического воздействия агонистические взаимодействия между мышами были прекращены: перегородка не убиралась. Лечебный эффект препарата на показатели клеточного иммунитета и тревожно-депрессивное состояние самцов мышей

исследовали при сравнении с группой тревожно-депрессивных самцов, которым вводили физиологический раствор. Эффективность препарата выясняли при сравнении с контрольным состоянием животных [28].

**Исследование лимфоцитов крови и органов иммунной системы.** На следующий день после последней инъекции препарата у животных всех групп одновременно брали кровь, извлекали тимус и селезенку и готовили клеточную суспензию из полученных органов. Весовой индекс тимуса и селезенки определяли по формуле: массу органа в мг/массу тела в г. Количество ядросодержащих клеток в крови, суспензиях тимуса и селезенки подсчитывали в камере Горяева и выражали в следующих единицах:  $10^6$ /мл для крови и  $10^6$ /орган для тимуса и селезенки. Процентное соотношение субпопуляций лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуориметрии. В работе использовали моноклональные антитела (BD Pharmingen) против маркеров CD3, CD4, меченные флуоресцеином-5-изотиоцианатом и CD25, CD16/CD32, CD8, меченные фикоэритрином. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США), используя программное обеспечение Cell Quest.

Анализ содержания клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла в исследуемых органах, проводили с помощью метода проточной цитофлуориметрии с применением ДНК-специфичного красителя — иодистого пропидия [21] с использованием цитофлуориметра FACSCalibur (Becton Dickinson, фильтр 585/42). Было определено процентное содержание клеток в фазе  $G_0/G_1$  (фаза покоя), пролиферирующих клеток (синтетическая фаза S, постсинтетическая и митотическая фазы  $G_2/M$  — гипердиплоидные), а также гиподиплоидных клеток, большинство из которых находится в состоянии апоптоза ( $A_0$ ). В таблицах приведен суммарный процент пролиферирующих клеток ( $S+G_2/M$ ).

**Поведенческие тесты.** Тест «перегородка» [25] оценивает поведенческую реакцию животных на партнера в соседнем отсеке общей клетки, разделенной прозрачной перегородкой с отверстиями. При тестировании крышка экспериментальной клетки заменяется прозрачным стеклом и через 5 мин (период активации животных и привыкания к новым условиям освещения) теста оценивали число подходов к перегородке и общее время, проведенное около перегородки, когда мышь касается ее лапами или носом, реагируя на партнера в соседнем отсеке. Время, когда особи демонстрировали боковые позы, не обращающая внимания на соседа, или сидели около перегородки спиной к ней, не учитывалось.

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) широко используется для выявления анксиолитических и анксиогенных свойств препаратов [30]. Лабиринт состоит из двух открытых ( $25 \times 5 \times 30$  см) и двух закрытых ( $25 \times 5 \times 30$  см) рукавов, расположенных крестообразно и установленных на высоте 50 см от пола. Все измерения проводились в затемненной комнате для тестирования. Экспериментальная клетка с исследуемой особью приносилась в ту же комнату за 5 мин до тестирования (период активации) перед помещением в ПКЛ. В течение 5 мин определялись параметры теста: число входов в открытые рукава, в центр и в закрытые рукава, представленные в виде процента от общего числа входов и выходов; время, проведенное в открытых рукавах, в центре и в закрытых рукавах, представленное в виде процента от общего времени тестирования, а также дополнительные параметры (число заглядываний под лабиринт, выглядываний из закрытых рукавов, переходов из одного закрытого рукава в другой). Лабиринт тщательно мыли и высушивали салфетками после каждого животного.

*Тест Порсолта.* Поведение животных в этом тесте является чувствительным к действию антидепрессантов [35] и может оценивать уровень депрессивности у самцов мышей. После 5 мин активации животных помещали в стакан с водой диаметром 9 см, высотой 20 см (температура воды  $25 \pm 1$  °C) и в течение 5 мин фиксировали общее время активного плавания и число активных действий, в течение которого животные старались выбраться наружу; общее время иммобильности: пассивного плавания животных — суммарное время полной неподвижности (зависание) и времени, когда животное поддерживало себя на поверхности слабыми движениями одной-двух лап (дрейф). Кроме того, фиксировали латентное время демонстрации полной иммобильности, которое регистрировали в том случае, если животные находились в этой позе не менее 3—4 с. Вода в стакане менялась после каждой особи.

Поведение мышей всех экспериментальных групп исследовали в режиме один тест в день в последовательности: перегородка, ПКЛ, тест Порсолта. Во время всех тестов осуществлялась видеозапись поведения животных с последующей обработкой видеоматериалов с использованием программы Observer XT (Noldus, The Netherlands).

**Статистическая обработка.** Проверка нормальности распределения количественных признаков была проведена с использованием критерия Шапиро—Уилка (Shapiro—Wilk's W-test). Поскольку выборки исследованных иммунологических показателей и параметров поведения в тесте «перегородка» и тесте Порсолта удовлетворяли гипотезе о нормальном распределении, были использованы методы параметрической статистики: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с фактором «группа» (контроль, тревожно-депрессивные самцы с введением физиологического раствора и тревожно-депрессивные самцы с введением препарата); последующее попарное сравнение иммунных показателей и параметров поведения в тесте Порсолта и тесте «перегородка» проводилось с помощью LSD теста. Так как большая часть параметров поведения в тесте ПКЛ не удовлетворяла гипотезе о нормальном распределении, для анализа использовали Н-критерий Краскела—Уоллиса, последующее сравнение проводилось при помощи критерия Манна—Уитни (Mann—Whitney, U-критерий). Анализ данных производился с помощью программы Statistica 6.0. Различия между экспериментальными группами считались статистически значимыми при  $p \leq 0.05$ . Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. В экспериментальных группах было по 5—7 животных в иммунологических и по 10 особей в поведенческих исследованиях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Влияние ронколейкина на весовые индексы и клеточный состав тимуса, селезенки и крови.** ANOVA выявил достоверное влияние фактора «группа» для весового индекса тимуса [ $F(2.14) = 3.96; p < 0.043$ ], количества клеток в крови [ $F(2.14) = 8.76; p < 0.003$ ], тимусе [ $F(2.14) = 4.67; p < 0.028$ ] и селезенке [ $F(2.14) = 4.87; p < 0.025$ ]. Попарные сравнения показали, что по сравнению с контролем у депрессивных животных с введением ронколейкина было уменьшено количество тимоцитов ( $p < 0.008$ ) и спленоцитов ( $p < 0.008$ ), и повышено количество лейкоцитов крови ( $p < 0.001$ ) (рис. 1). Были обнаружены различия между группами с введением физиологического раствора и препарата по лейкоцитозу крови ( $p < 0.026$ ) и по весовому индексу тимуса ( $p < 0.014$ ) (табл. 1).

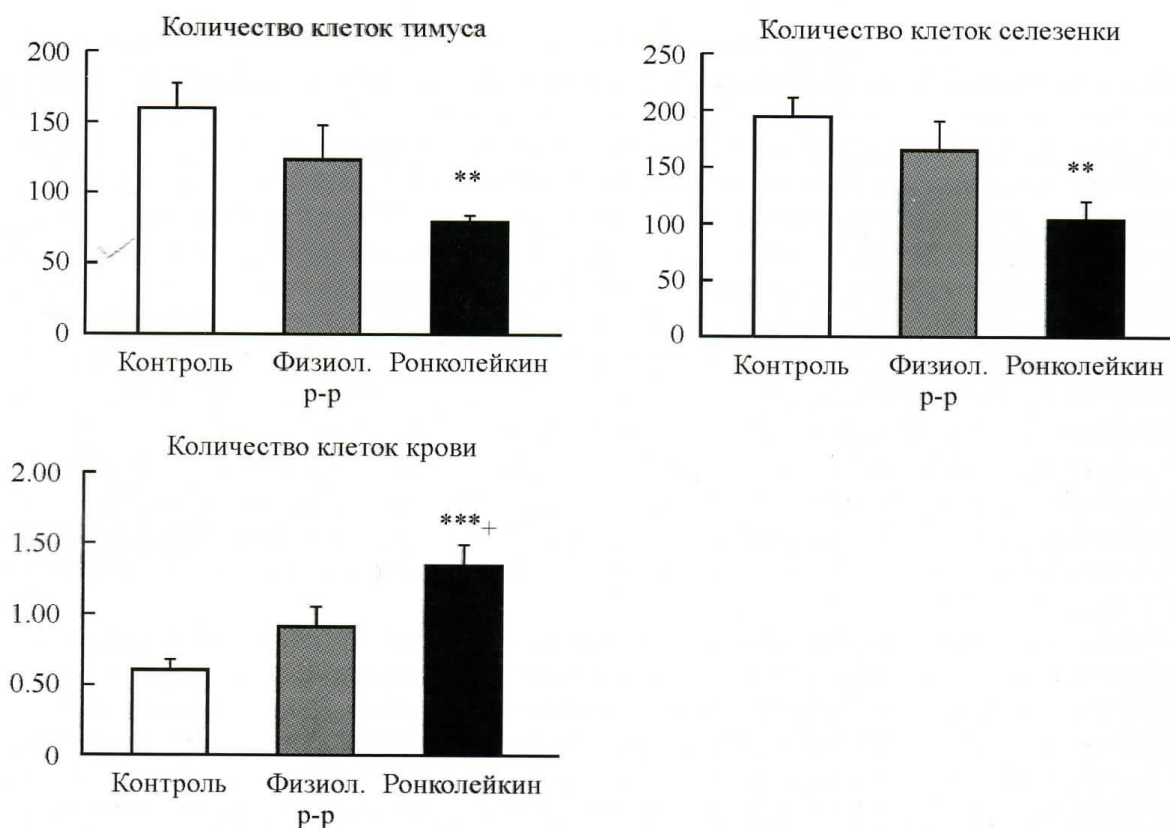


Рис. 1. Общее количество клеток в тимусе, селезенке (10<sup>6</sup> в органе) и в крови (10<sup>6</sup> в 1 мл) контрольных и тревожно-депрессивных мышей после введения физиологического раствора и ронколейкина.

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs контроль; +  $p < 0.05$ , vs «активный» контроль (физиологический раствор), LSD-тест.

**Влияние ронколейкина на субпопуляционный состав лимфоцитов в тимусе и селезенке.** В тимусе ANOVA выявил достоверное влияние фактора «группа» для % CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> [F(2.18) = 6.1;  $p < 0.009$ ], CD 8<sup>+</sup>4<sup>+</sup> [F(2.18) = 8.88;  $p < 0.002$ ], в тимусе и для CD8<sup>+</sup> [F(2.16) = 4.83;  $p < 0.023$ ], CD3<sup>+</sup>25<sup>-</sup> [F(2.16) = 7.10;  $p < 0.006$ ] в селезенке.

Попарные сравнения данных в тимусе показали более низкий %CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> у депрессивных животных с введением физиологического раствора по сравнению с контролем ( $p < 0.002$ ) (табл. 1). В аналогичном сравнении %CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> был значительно выше по отношению к контролю ( $p < 0.001$ ), снижаясь под влиянием ронколейкина ( $p < 0.039$ ). В селезенке % CD8<sup>+</sup> и %CD3<sup>+</sup>25<sup>-</sup> у мышей с введением ронколейкина был выше как по сравнению с депрессивными самцами с введением физиологического раствора ( $p < 0.015$  и  $p < 0.005$  соответственно), так и по отношению к контролю ( $p < 0.016$  и  $p < 0.005$  соответственно).

**Влияние ронколейкина на показатели пролиферации клеток в тимусе и селезенке, % от общего количества клеток.** ANOVA выявил: достоверное влияние фактора «группа» в тимусе для покоящихся клеток (фаза G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) [F(2.18) = 5.90;  $p < 0.011$ ]; и для пролиферирующих клеток (S+G<sub>2</sub>/M) [F(2.18) = 6.16;  $p < 0.009$ ], а также в селезенке для клеток, находящихся в состоянии апоптоза (фаза A<sub>0</sub>) [F(2.18) = 3.69;  $p < 0.045$ ].

В тимусе, по сравнению с интактными животными, процентное содержание покоящихся клеток было снижено у групп жертв с введением физиологического

Таблица 1  
Субпопуляционный состав лимфоцитов в органах иммунной системы

Показатель, %	Контроль	Состав лимфоцитов сразу после стресса [11]	Период покоя (физиологический раствор)	Период покоя (ронколейкин)
<b>Тимус</b>				
CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>-</sup>	11.44 ± 0.76	Не изменен	7.32 ± 0.65**	9.56 ± 1.05
CD4 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup>	83.23 ± 0.70	Снижен	89.81 ± 0.63***	86.33 ± 1.67 <sup>+</sup>
CD4 <sup>-</sup> 8 <sup>+</sup>	1.89 ± 0.18	Не изменен	0.86 ± 0.13	1.40 ± 0.24
CD3 <sup>+</sup> 25 <sup>-</sup>	78.40 ± 1.86	Снижен, CD3 <sup>+</sup>	74.69 ± 2.89	74.87 ± 3.04
CD3 <sup>+</sup> 25 <sup>+</sup>	2.16 ± 0.21	Снижен, CD25 <sup>+</sup>	1.94 ± 0.34	2.45 ± 0.33
CD3 <sup>-</sup> 25 <sup>+</sup>	0.54 ± 0.08	Не изменен	0.50 ± 0.06	0.70 ± 0.04
CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup>	2.54 ± 0.38	Не изменен	2.77 ± 0.45	2.39 ± 0.40
Весовой индекс	1.84 ± 0.11	Снижен	1.56 ± 0.14	2.28 ± 0.27 <sup>+</sup>
<b>Селезенка</b>				
CD19 <sup>+</sup>	60.37 ± 0.79	Повышен	54.46 ± 1.08	49.92 ± 6.08
CD4 <sup>+</sup>	18.38 ± 0.43	Снижен	19.86 ± 1.02	16.77 ± 1.97
CD8 <sup>+</sup>	12.37 ± 0.53	Снижен	12.57 ± 0.57	18.73 ± 2.86** <sup>+</sup>
CD3 <sup>+</sup> 25 <sup>-</sup>	30.75 ± 0.40	Снижен, CD3 <sup>+</sup>	30.94 ± 1.33	36.30 ± 1.39*** <sup>++</sup>
CD3 <sup>+</sup> 25 <sup>+</sup>	1.35 ± 0.21	Снижен, CD25 <sup>+</sup>	1.84 ± 0.26	2.05 ± 0.26
CD3 <sup>-</sup> 25 <sup>+</sup>	0.92 ± 0.12	Не изменен	0.94 ± 0.08	0.90 ± 0.10
CD16 <sup>+</sup> /32 <sup>+</sup>	65.75 ± 1.42	Снижен	60.86 ± 1.82	60.30 ± 3.93
Весовой индекс	4.17 ± 0.15	Не изменен	4.44 ± 0.31	4.41 ± 0.17

Примечание. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контролем; <sup>+</sup>  $p < 0.05$ , <sup>++</sup>  $p < 0.01$ , по сравнению с физиологическим раствором, LSD-тест.

ческого раствора ( $p < 0.007$ ) и препарата ( $p < 0.010$ ), а процентное содержание пролиферирующих клеток было повышено у обеих групп жертв ( $p < 0.006$  и  $p < 0.009$  соответственно). В селезенке ни по одному из параметров сравнений экспериментальных групп не было обнаружено существенных различий (табл. 2).

#### Эффекты ронколейкина на поведение тревожно-депрессивных животных.

*Тест «приподнятый крестообразный лабиринт».* Непараметрический дисперсионный анализ выявил достоверное влияние фактора «группа» на время, проведенное в закрытых рукавах [ $H(2, N = 33) = 6.73, p < 0.035$ ] и центре лабиринта [ $H(2, N = 33) = 6.55, p < 0.038$ ]. Также было обнаружено влияние фактора, не достигавшее уровня статистической значимости, на число заглядываний под лабиринт [ $H(2, N = 33) = 5.96, p < 0.051$ ].

Попарное сравнение групп критерием Манна—Уитни выявило, что у животных, получавших ронколейкин, достоверно меньше время, проведенное в центре лабиринта ( $p < 0.010$ ), и достоверно больше время, проведенное в закрытых рукавах ( $p < 0.010$ ), по сравнению с контрольной группой (табл. 3). У животных, получавших физиологический раствор, обнаружены сходные, но недостоверные изменения ( $p < 0.071$  и  $p < 0.061$  соответственно). Также было показано, что животные из обеих экспериментальных групп достоверно меньше заглядывают под лабиринт по сравнению с контрольными особями ( $p < 0.042$  для группы с введением физиологического раствора и  $p < 0.037$  для группы с введением ронколейкина). Статистически значимых отличий между



Таблица 2

Процентное соотношение клеток в разных фазах клеточного цикла в тимусе и селезенке

Показатель, %	Контроль	Процентное соотношение клеток сразу после стресса [4]	Период покоя (физиологический раствор)	Период покоя (ронколейкин)
<b>Тимус</b>				
A <sub>0</sub>	0.11 ± 0.03	Не изменено	0.11 ± 0.04	0.14 ± 0.04
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	89.96 ± 0.70	Повышено	87.49 ± 0.40**	87.61 ± 0.58**
G <sub>2</sub> /M+S	9.93 ± 0.69	Снижено	12.40 ± 0.38**	12.24 ± 0.56**
<b>Селезенка</b>				
A <sub>0</sub>	0.07 ± 0.02	Снижено	0.01 ± 0.01	0.07 ± 0.0
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	96.36 ± 0.52	Снижено	94.03 ± 1.00	94.9 ± 0.7
G <sub>2</sub> /M+S	3.57 ± 0.53	Повышено	5.83 ± 0.93	5.0 ± 0.7

Примечание. \*\*  $p < 0.01$ , по сравнению с контролем. LSD-тест.

животными, получавшими физиологический раствор и ронколейкин, обнаружено не было.

*Тест «перегородка».* ANOVA выявил достоверное влияние фактора «группа» для параметров числа подходов [ $F(2.31) = 3.21$ ;  $p \leq 0.05$ ] и общее время реакции [ $F(2.31) = 8.28$ ;  $p < 0.001$ ] партнера. Попарные сравнения показали сниженные уровни числа и времени пребывания возле перегородки у депрессивных животных после введения ронколейкина по сравнению с интактным состоянием ( $p < 0.035$  и  $p < 0.001$  соответственно) и с животными с введением физиологического раствора ( $p < 0.039$  и  $p < 0.002$  соответственно) (рис. 2).

*Тест Порсолта.* ANOVA выявил достоверное влияние фактора «группа» при введении ронколейкина для параметров: латентное время демонстрации первой иммобильности (неподвижности) [ $F(2.31) = 6.04$ ;  $p < 0.006$ ],

Таблица 3

Поведение самцов мышей в тесте приподнятого крестообразного лабиринта

Поведенческие параметры	Контроль	Период покоя (физиологический раствор)	Период покоя (ронколейкин)
Открытые рукава, с	1.97 ± 1.59	0.21 ± 0.21	0 ± 0
Открытые рукава, N	1.88 ± 1.26	0.45 ± 0.45	0 ± 0
Центр, с	11.24 ± 2.78	5.18 ± 1.75	2.97 ± 0.53**
Центр, N	50.52 ± 0.35	50.91 ± 0.91	50.00 ± 0.00
Закрытые рукава, с	86.79 ± 3.68	94.61 ± 1.90	97.03 ± 0.53**
Закрытые рукава, N	47.60 ± 1.39	48.64 ± 0.97	50.00 ± 0
Выглядывания, N	5.64 ± 1.15	4.55 ± 0.78	4.91 ± 0.69
Заглядывания, N	2.00 ± 0.54	0.55 ± 0.21*	0.55 ± 0.25*
Переходы, N	4.4 ± 0.6	2.27 ± 0.82	2.64 ± 1.07
Число животных в группе	11	11	11

Примечание. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , по сравнению с контролем. Объяснение используемых параметров приводится по тексту статьи. N — количество эпизодов; с — общее время демонстрации формы поведения, выраженное в секундах (критерий Манна—Уитни).



Рис. 2. Поведение контрольных и тревожно-депрессивных мышей после введения физиологического раствора и ронколейкина в тесте «перегородка».

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs контроль; +  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ , vs «активный» контроль (физиологический раствор).

число эпизодов активного избегания [ $F(2.31) = 3.30$ ;  $p \leq 0.05$ ], а также влияние, не достигавшее уровня статистической значимости, на пассивное плавание [ $F(2.31) = 2.91$ ;  $p \leq 0.07$ ]. Полученные данные показали, что по сравнению с интактными животными латентное время первой неподвижности у животных с введением физиологического раствора было меньше ( $p < 0.002$ ), а время иммобильности больше ( $p < 0.022$ ) (рис. 3). Число эпизодов актив-

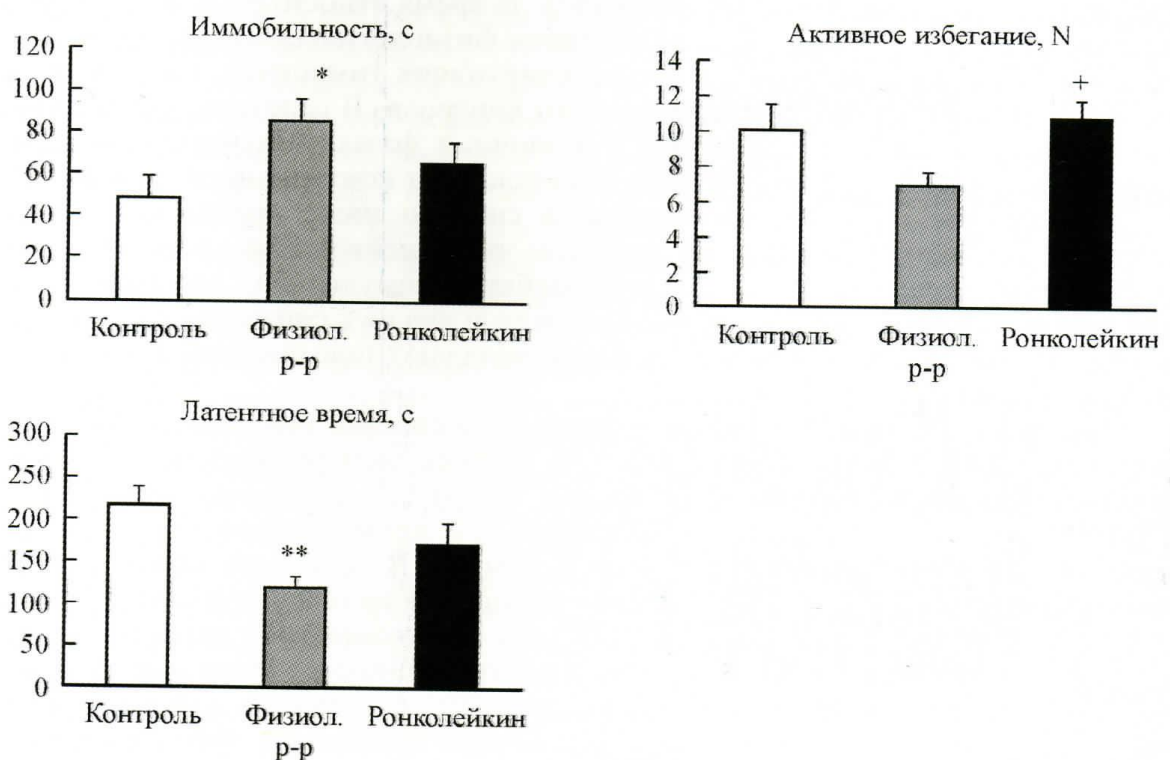


Рис. 3. Поведение контрольных и тревожно-депрессивных мышей после введения физиологического раствора и ронколейкина в тесте Порсолта.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  vs контроль; +  $p < 0.05$ , vs «активный» контроль (физиологический раствор).

ного избегания было больше после введения ронколейкина по отношению к депрессивным животным, которым вводили физиологический раствор ( $p < 0.020$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сопоставление результатов предыдущих исследований состояния иммунной системы животных сразу после 20 дней социального стресса [4, 10, 11] с данными, полученными в настоящей работе (контрольная группа и группа после 14-дневного отдыха), позволило сделать заключение о динамике иммунного статуса в течение двухнедельного периода относительного покоя, когда агонистические взаимоотношения прекращались (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что в период покоя произошло приближение к уровню интактного контроля общего количества клеток в тимусе, селезенке и количества лейкоцитов крови. Восстановилось до нормы содержание большинства субпопуляций лимфоцитов тимуса и селезенки. Исключение составлял сохраняющийся дисбаланс зрелых и незрелых тимоцитов. Однако, если сразу после прекращения агонистических взаимодействий в вилочковой железе было отмечено снижение содержания малодифференцированных клеток ( $CD4^+8^+$ ), то после периода отдыха данный показатель повышался относительно интактного контроля с одновременным снижением процента зрелых тимоцитов ( $CD4^+8^-$  и  $CD4^-8^+$ ). Таким образом, после периода отдыха соотношение зрелых и незрелых тимоцитов сдвигалось в сторону последних в противоположность ситуации, которая наблюдалась сразу после окончания конфронтаций. Хронический социальный стресс привел к угнетению пролиферативной активности клеток тимуса [3]. За время относительного отдыха, в течение которого мыши получали инъекции физиологического раствора, произошло увеличение количества пролиферирующих тимоцитов, которое даже начало превышать показатель интактного контроля. В селезенке процентное соотношение клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла, за период покоя пришло в норму и не отличалось от контрольного уровня.

Хроническое введение ронколейкина снизило ниже нормы количество клеток в тимусе и селезенке, но при этом число лейкоцитов крови увеличилось. Можно предположить, что ронколейкин стимулировал миграцию клеток в циркуляторное русло, отражением чего и явилось снижение содержания в тимусе зрелых субпопуляций, которые обладают повышенной миграционной активностью.

При анализе изменений субпопуляционного состава лимфоцитов было обнаружено, что ронколейкин привел к уровню контроля процент  $CD4^+8^+$  дубль-позитивных тимоцитов (незрелые клетки), а также процент  $CD4^+8^-$ ,  $CD4^-8^+$  (зрелые Т-хелперы и Т-эффекторы), т. е. нормализовал процессы центральной дифференцировки Т-клеток в тимусе. В селезенке под влиянием ронколейкина существенно повысился процент общего количества Т-клеток и Т-эффекторов/киллеров ( $CD3^+$  и  $CD8^+$ ) как по отношению к самцам с введением физиологического раствора, так и по отношению к интактному контролю. Ронколейкин никак не повлиял на процессы клеточного деления в органах иммунной системы. Суммируя полученные данные по эффектам ронколейкина на показатели иммунной системы, нарушенные под влиянием хронического социального стресса, следует отметить их слабую выраженность. Возможно, это связано с тем, что в период относительного отдыха от ежедневных конфронтаций многие показатели измененного иммунного ста-

туса восстанавливаются и при отсутствии какого-либо воздействия. Применение ронколейкина приводит к уровню интактного контроля те параметры, которые остались нарушенными и после двухнедельного отсутствия агонистических взаимодействий: процессы центральной дифференцировки Т-клеток и содержание Т-лимфоцитов в селезенке, что укладывается в представления о действии интерлейкина-2 на клетки иммунной системы [5].

Ранее неоднократно было показано, что длительный хронический социальный стресс ведет к развитию выраженного состояния тревоги, снижению коммуникативности и развитию депрессивности [1, 27]. В период относительного покоя восстановилась коммуникативность, оцениваемая поведенческой реакцией в тесте «перегородка», однако тревожность в тесте ПКЛ и депрессивность, оцениваемая латентным временем и суммарным временем иммобильности, была все еще высокой. Сохранение измененного под влиянием хронического социального стресса уровня тревожности в период относительного покоя было показано и ранее [12, 15]. При этом ронколейкин несколько усилил тревожность, оцениваемую по снижению времени пребывания в центре и увеличению времени пребывания в закрытых рукавах ПКЛ, снизил общительность, оцениваемую по реакции на партнера (анксиогенный эффект) и оказал стимулирующий эффект на поведение активного избегания в тесте Порсолта. Отмечается также и некоторое снижение времени общей иммобильности и увеличение латентного времени демонстрации первой неподвижности, в результате чего эти показатели уже не отличаются статистически значимо от контроля, что может расцениваться как слабый антидепрессивный эффект ронколейкина.

Литературные данные о влиянии интерлейкина-2 на состояние тревожности крайне противоречивы. Был выявлен его анксиогенный эффект [31, 32], что совпадает с нашими результатами. Показано также отсутствие влияния цитокина на уровень тревожности [13, 22, 29]. Существуют данные, свидетельствующие о том, что в зависимости от дозы, а также при использовании разных тестов интерлейкин-2 способен оказывать либо анксиолитический, либо, как и в нашем эксперименте, анксиогенный эффект [23, 24].

В литературе имеются также сведения, что интерлейкин-2 оказывает про-депрессивный эффект у грызунов и человека [14, 17, 19, 22]. В нашем эксперименте он оказал скорее стимулирующий эффект, на фоне которого было выявлено слабое антидепрессивное действие на поведение самцов мышей со сформированным тревожно-депрессивным состоянием.

Предполагается, что функциональное состояние лимфоцитов тесно связано с метаболизмом нервных клеток, продукцией нейромедиаторов и гормонов, нейропсихическими расстройствами [20]. Скорее всего, психотропный эффект ронколейкина, наблюдаемый в нашем эксперименте и при назначении препарата людям и животным, можно объяснить его воздействием на серотонинергическую систему. Показано, что интерлейкин-2 активирует деградацию триптофана по кинурениновому пути, снижая, таким образом, синтез серотонина в мозге [16]. Кроме того, он ингибирует серотонинергическую систему в различных областях коры головного мозга, уменьшая уровень внеклеточного 5-НТ в медиальной префронтальной, затылочной и височной коре у интактных мышей [22], и способен активировать серотонинергическую систему в гиппокампе [33]. Объяснением противоречивости данных могут быть особенности используемых моделей. Как правило, эти исследования проводятся на интактных животных. В нашем эксперименте мы имеем дело с измененной активностью серотонинергической системы мозга и изменением серотонинового метаболизма в периферических тканях в процессе развития

тревожно-депрессивного расстройства. Так показано, что у животных после длительного социального стресса развивается гипофункция серотонинергической активности в мозге и снижается уровень серотонина в тромбоцитах [1]. Подводя итог, можно сказать, что полученные данные косвенно свидетельствуют о том, что тревожность и депрессивность могут иметь разные механизмы взаимосвязи с иммунной системой. Это является еще одним подтверждением высказанного ранее предположения о том, что тревога и депрессия на стадии сформированной патологии [9] находятся под контролем разных регуляторных механизмов и требуют независимой фармакологической коррекции. При этом использование иммуностимулятора ронколейкина оказывается неэффективным для коррекции поведенческих нарушений, возникших под влиянием хронического социального стресса.

Ранее было показано, что применение психотропных препаратов (диазепама и кломипрамина) оказало выраженный корректирующий эффект на психоэмоциональное состояние и показатели иммунной системы [3, 4]. Воздействие, направленное преимущественно на иммунокомпетентные клетки (ронколейкин), оказало слабо выраженный и неоднозначный эффект на поведенческие и психоэмоциональные характеристики животных. Таким образом, первичное воздействие на психоэмоциональное состояние оказалось более эффективным в плане комплексной коррекции психонейроиммунных нарушений, чем попытка через ликвидацию иммунных дисфункций улучшить психоэмоциональные характеристики экспериментальных животных. Исследование с очевидностью показало, что необходим поиск комплексных методов терапии психогенных иммунокомпрометированных состояний, учитывающих их генез, и необходим подбор препаратов для воздействия на ключевые точки развития патологического процесса.

Исследование поддержано программами президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине», грант ФНМ-16 и «Молекулярная и клеточная биология», грант 6.25.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] *Августиневич Д. Ф., Алексеенко О. В., Бакитановская И. В., Корякина Л. А., Липина Т. В., Тендитник М. В., Бондарь Н. П., Коваленко И. Л., Кудрявцева Н. Н.* Динамические изменения серотонинергической и дофаминергической активности мозга в процессе развития тревожной депрессии: экспериментальное исследование. *Успехи физиол. наук.* 35 (4) : 19—40. 2004.

[2] *Грязева Н. И., Шурлыгина А. В., Вербицкая Л. В., Мельникова Е. В., Кудрявцева Н. Н., Труфакин В. А.* Изменение активности лактат- и сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови у самцов с агрессивным и субмиссивным типами поведения. *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 129 (1) : 53—56. 2000.

[3] *Кудрявцева Н. Н., Смагин Д. А., Галямина А. Г., Шурлыгина А. В., Мельникова Е. В., Тендитник М. В., Пантелеева Н. Г., Труфакин В. А.* Эффекты кломипрамина на изменение субпопуляционного состава лимфоцитов и клеточного цикла в тимусе и селезенке, возникающее у депрессивных самцов мышей под влиянием хронического социального стресса. *Психофарм. биол. наркол.* 11 (1—2) : 2677—2687. 2011.

[4] *Кудрявцева Н. Н., Шурлыгина А. В., Мельникова Е. В., Тендитник М. В., Бондарь Н. П., Пантелеева Н. Г., Смагин Д. А., Колесников Н. Н., Труфакин В. А.* Нарушение клеточного цикла в тимусе и селезенке у самцов мышей под влиянием хронического социального стресса: эффекты диазепама. *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 151 (4) : 391—394. 2011.

[5] *Машковский М. Д.* Лекарственные средства. М. Новая волна. 2008.

- [6] Меркурьева А. В., Билич Г. Л., Нарциссов Р. П. Биохимические и цитохимические методы определения активности ферментов и фермент-субстратных систем различной клеточной локализации. Метод. рекоменд. М.—Йошкар-Ола. 1982.
- [7] Островский М. В., Моисеев А. Н., Сахарова Е. Д., Романова О. В., Гречухин А. Н., Варюхин А. В. Ронколейкин: методические рекомендации для ветеринарных врачей. СПб. Альтер Эго. 2010.
- [8] Попова Н. А., Ильницкая С. И., Колесникова Л. А., Каледин В. И., Кудрявцева Н. Н. Влияние социального конфликта на некоторые параметры неспецифической резистентности у мышей. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 82 (12) : 12—17. 1996.
- [9] Смагин Д. А., Галямина А. Г., Бондарь Н. П., Кудрявцева Н. Н. Влияние кломипрамина на тревожно-депрессивное состояние, вызванное хроническим социальным стрессом у самцов мышей. Психофарм. биол. наркол. 11 (1—2) : 2666—2676. 2011.
- [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. 90 (12) : 1522—1529. 2004.
- [11] Тендитник М. В., Шурлыгина А. В., Мельникова Е. В., Пантелеева Н. Г., Смагин Д. А., Бондарь Н. П., Кудрявцева Н. Н., Труфакин В. А. Эффекты диазепама на субпопуляционный состав лимфоцитов иммунокомпетентных органов тревожных самцов мышей. Бюл. СО РАМН 30 (4) : 46—50. 2010.
- [12] Avgustinovich D. F., Kovalenko I. L., Kudryavtseva N. N. A model of anxious depression: persistence of behavioral pathology. *Neurosci. Behav. Physiol.* 35 (9) : 917—924. 2005.
- [13] Anisman H., Merali Z. Anhedonic and anxiogenic effects of cytokine exposure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 461 : 199—233. 1999.
- [14] Baron D. A., Hardie T., Baron S. H. Possible association of interleukin-2 treatment with depression and suicide. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 93 (7) : 799—800. 1993.
- [15] Berton O., McClung C. A., Dileone R. J., Krishnan V., Renthal W., Russo S. J., Graham D., Tsankova N. M., Bolanos C. A., Rios M., Monteggia L. M., Self D. W., Nestler E. J. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311. 864—868. 2006.
- [16] Brown R. R., Lee C. M., Kohler P. K., Hank J. A., Storer B. E., Sondel P. M. Altered tryptophan and neopterin metabolism in cancer patients treated with recombinant interleukin-2. *Cancer Res.* 49 : 4941—4944. 1989.
- [17] Capuron L., Ravaut A., Dantzer R. Early depressive symptoms in cancer patients receiving interleukin 2 and/or interferon alfa-2b therapy. *J. Clin. Oncol.* 18 (10) : 2143—2151. 2000.
- [18] Devoino L. V., Alperina E. L., Kudryavtseva N. N., Popova N. K. Immune responses in male mice with aggressive and submissive behavior patterns: strain differences. *Brain. Behav. Immun.* 7 : 91—96. 1993.
- [19] Dunn A. J., Swiergiel A. H., de Beaurepaire R. Cytokines as mediators of depression: What can we learn from animal studies? *Neurosci. Behav. Rev.* 29 : 891—909. 2005.
- [20] Gladkevich A., Kauffman H. F., Korf J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 28 (3) : 559—576. 2004.
- [21] Gould M. K., Vu X. L., Seebeck T., de Koning H. P. Quantification of apoptosis and the cell cycle distribution of primary B cells using propidium iodide AfCS procedure protocol *Anal. Biochem.* 382 (2) : 87—93. 2008.
- [22] Karrenbauer B. D., Müller C. P., Ho Y. J., Spanagel R., Huston J. P., Schwarting R. K., Pawlak C. R. Time-dependent in-vivo effects of interleukin—2 on neurotransmitters in various cortices: relationships with depressive-related and anxiety-like behaviour. *J. Neuroimmunol.* 237 (1—2) : 23—32. 2011.
- [23] Karrenbauer B. D., Ho Y.J., Ludwig V., Lohn J., Spanagel R., Schwarting R. K. W., Pawlak C. R. Time-dependent effects of striatal interleukin-2 on open-field behavior in rats. *J. Neuroimmunol.* 208 : 10—18. 2009.
- [24] Kauffman H. F., Korf J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 3 : 559—576. 2004.
- [25] Kudryavtseva N. N. Experience of defeats decreases the behavioral reactivity to conspecific in partition test. *Behav. Proces.* 32 : 297—304. 1994.

- [26] *Kudryavtseva N. N.* Sensory contact model: protocol, control, applications. NY. Nova Science Publishers Inc. 2010.
- [27] *Kudryavtseva N. N., Avgustinovich D. F.* Behavioral and physiological markers of experimental depression induced by social conflicts (DISC). *Aggress. Behav.* 24 : 271—286. 1998.
- [28] *Kudryavtseva N. N., Avgustinovich D. F., Bondar N. P., Tenditnik M. V., Kovalenko I. L.* An experimental approach for the study of psychotropic drug effects under simulated clinical conditions. *Curr. Drug. Metab.* 9 (4) : 352—360. 2008.
- [29] *Lacosta S., Merali Z., Anisman H.* Influence of acute and repeated interleukin-2 administration on spatial learning, locomotor activity, exploratory behaviors, and anxiety. *Behav. Neurosci.* 113 (5) : 1030—1041. 1999.
- [30] *Lister R. G.* The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*. 92 (2) : 180—185. 1987.
- [31] *Myint A. M., Schwarz M. J., Steinbusch H. W., Leonard B. E.* Neuropsychiatric disorders related to interferon and interleukins treatment. *Metab. Brain. Dis.* 24 (1) : 55—68. 2009.
- [32] *Nagata T., Yamada H., Iketani T., Kiriike N. J.* Relationship between plasma concentrations of cytokines, ratio of CD4 and CD8, lymphocyte proliferative responses, and depressive and anxiety state in bulimia nervosa. *Psychosom. Res.* 60 (1) : 99—103. 2006.
- [33] *Pauli S., Lithorst A. C. E., Reul J. M. H. M.* Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-2 differentially affect hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioral activity, body temperature and hypothalamic-pituitary adrenocortical axis activity in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 10 : 868—878. 1998.
- [34] *Pawlak C., Rainer K.W., Schwarting R. K. W.* Striatal microinjections of interleukin-2 and rat behaviour in the elevated plus-maze. *Behav. Brain. Res.* 168 : 339—344. 2006.
- [35] *Porsolt R. D., Le Pichon M., Jalfre M.* Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 266 (5604) : 730—732. 1977.

Поступила 29 V 2013  
После доработки 22 I 2014