

ЭФФЕКТЫ КЛОМИПРАМИНА НА ИЗМЕНЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА И КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ЛИМФОЦИТОВ ТИМУСА И СЕЛЕЗЕНКИ, ВОЗНИКАЮЩЕЕ У ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫХ САМЦОВ МЫШЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА

Наталья Николаевна Кудрявцева

Институт цитологии и генетики СО РАН, Сектор нейрогенетики социального поведения, зав. сектором, д-р биол. наук; акад. Лаврентьева пр-кт, 10, Новосибирск, 630090, Россия, тел.: +7 383-363-49-65, e-mail: n.n.kudryavtseva@gmail.com

Дмитрий Александрович Смагин

Институт цитологии и генетики СО РАН, Сектор нейрогенетики социального поведения, мл. научн. сотр.; акад. Лаврентьева пр-кт, 10, Новосибирск, 630090, Россия, тел.: +7 383-363-49-65, e-mail: smagin@bionet.nsc.ru

Анна Георгиевна Галямина

Институт цитологии и генетики СО РАН, Сектор нейрогенетики социального поведения, аспирантка; акад. Лаврентьева пр-кт, 10, Новосибирск, 630090, Россия, тел.: +7 383-363-49-65, e-mail: galiamina.anna@yandex.ru

Анна Вениаминовна Шурлыгина

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Лаборатория иммуноморфологии, д-р мед. наук, профессор; Тимакова ул., 2, Новосибирск, 630117, Россия, тел.: +7 383-335-95-31, e-mail: lymfology@soramn.ru

Евгения Владимировна Мельникова

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Лаборатория иммуноморфологии, научн. сотр.; Тимакова ул., 2, Новосибирск, 630117, Россия, тел.: +7 383-335-95-31, e-mail: lymfology@soramn.ru

Михаил Владимирович Тендитник

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Лаборатория иммуноморфологии, канд. биол. наук; Тимакова ул., 2, Новосибирск, 630117, Россия, тел.: +7 383-335-95-31, e-mail: lymfology@soramn.ru

Наталья Григорьевна Пантелеева

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Лаборатория иммуноморфологии, научн. сотр.; Тимакова ул., 2, Новосибирск, 630117, Россия, тел.: +7 383-335-95-31, e-mail: lymfology@soramn.ru

Валерий Алексеевич Труфакин

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Лаборатория иммуноморфологии, акад. РАМН, руководитель лаборатории; Тимакова ул., 2, Новосибирск, 630117, Россия, тел.: +7 383-335-95-31, e-mail: lymfology@soramn.ru

Резюме

ОБОСНОВАНИЕ. Хронический социальный стресс, вызванный опытом поражений в ежедневных агонистических взаимодействиях, ведет к развитию тревожно-депрессивного состояния у самцов мышей, которое сопровождается нарушением клеточного и гуморального иммунитета. Целью работы было исследование влияния антидепрессанта кломипрамина на различные звенья иммунитета у депрессивных самцов мышей.

МЕТОДЫ. Кломипрамин (40 мг/кг, в/б) и для сравнения физиологический раствор вводили тревожно-депрессивным самцам мышей в течение 2-недель на фоне относительного покоя, в течение которого агонистические взаимодействия прекращались. По окончании у самцов исследовали клеточность тимуса, селезенки и крови, субпопуляционный состав спленоцитов и тимоцитов, а также процентное соотношение клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла и в состоянии апоптоза в тимусе и селезенке, а также активность лактатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Кломипрамин не привел к нормализации изменившегося под влиянием социального стресса субпопуляционного состава лимфоцитов в тимусе и селезенке тревожно-депрессивных самцов. В тимусе изменения в процентном соотношении клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла, возникшие при развитии тревожно-депрессивного состояния полностью восстанавливались в период двухнедельного отдыха. Кломипрамин восстановил нарушение процессов пролиферации в селезенке. Повышенный уровень содержания лейкоцитов в крови и весовой индекс селезенки, а также активность лактатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови у тревожно-депрессивных мышей после воздействия препаратом приблизились к контрольному уровню.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Кломипрамин частично восстановил измененные параметры иммунитета. Рассматривается возможная взаимосвязь между нарушением клеточного цикла, снижением клеточного иммунитета и хронической тревогой, возникающими под влиянием хронического социального стресса.

Получена: 24 марта 2011 г.; Принята: 13 июня 2011 г.

Цитирование этой статьи: Психофармакол биол наркол. 2011; 11(1–2): 2677–2687

Корреспонденцию следует отправлять Наталии Николаевне Кудрявцевой n.n.kudryavtseva@gmail.com

Ключевые слова

социальный стресс; тревожно-депрессивное расстройство; кломипрамин; клеточный цикл; субпопуляции лимфоцитов

Известно, что хронический социальный стресс, вызванный повторным опытом социальных поражений в ежедневных межсамцовых конфронтациях, ведет к развитию смешанного тревожно-депрессивного расстройства у самцов мышей [1, 2]. Кроме того, у таких особей наблюдается изменение многих показателей клеточного и гуморального иммунитета, свидетельствующее о развитии иммунодефицитных состояний [3–5].

Иммунный ответ на введение эритроцитов барана у мышей под влиянием социального стресса снижался [3], изменялся субпопуляционный состав лимфоцитов и снижались количество клеток в тимусе и в селезенке [5] и общая резистентность [6], увеличивалось метастазирование аденокарциномы легких Льюис [7, 8].

Широко используемый в клинике анксиолитик диазепам, который эффективно купирует состояние тревоги у людей [9] и животных [10], предотвращал развитие многих изменений в субпопуляционном составе лимфоцитов и нарушение клеточного цикла в органах иммунной системы [11, 12], а также снижал скорость метастазирования перевиваемой опухоли [13].

Таким образом, снижение уровня тревоги предотвращало развитие изменений в иммунном статусе животных по многим показателям.

Антидепрессант кломипрамин широко используется в клинике для лечения депрессии у людей. В наших исследованиях было показано [14], что этот препарат после двух недельного введения тревожно-депрессивным мышам в период относительного отдыха на фоне прекращения агонистических взаимодействий, оказывал лечебный (антидепрессивный) эффект у мышей, но при этом усиливал у них тревожность.

Целью этого исследования было изучение, как изменение психоэмоционального состояния под воздействием кломипрамина влияет на показатели клеточного иммунитета.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на половозрелых самцах мышей линии C57BL/6J в возрасте 2,5–3 мес., массой тела 26–28 г, которых разводили в стандартных условиях вивария Института цитологии и гене-

тики СО РАН, пищу (гранулы) и воду животные получали в неограниченном количестве при световом режиме 12 × 12 часов. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/ЕЕС).

Формирование тревожно-депрессивного состояния у самцов мышей под влиянием хронического социального стресса

Тревожно-депрессивное состояние, сопровождающееся развитием выраженного иммунодефицита по многим показателям, продуцировали хроническим социальным стрессом, вызванным повторным опытом социальных поражений в ежедневных межсамцовых конфронтациях [15].

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 (15.00–17.00 часов) убрали 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 минут, вновь устанавливая между ними перегородку. В других ситуациях тест продолжался 10 минут.

После 20-ти дней у самцов с повторным опытом социальных поражений развивается тревожно-депрессивное состояние [1, 2]. В качестве контроля использовали самцов, помещенных на пять дней в индивидуальные клетки для снятия эффекта групповых взаимодействий и не имевших последовательного опыта агонистических взаимодействий.

Предполагается, что это наиболее оптимальный контроль в наших экспериментальных условиях, который рассматривается в качестве интактного состояния мышей [15].

Фармакологическое воздействие

Для купирования тревожно-депрессивного состояния животных использовали трициклический антидепрессант кломипрамин (clomipramine), который отличается от классического антидепрессанта имипрамина наличием в молекуле атома хлора. По фармакологическим свойствам близок к имипрамину, но обладает более сильным блокирующим влиянием на обратный нейрональный захват серотонина и норадреналина [9].

На следующий день после 20-й конфронтации, в период относительного отдыха (покоя), в течение которого агонистические взаимодействия прекращались (перегородку не убрали), одной группе тревожно-депрессивных мышей начинали вводить физиологический раствор в течение двух недель, другой группе вводили в аналогичном режиме кломипрамин (40 мг/кг, в/б, SIGMA).

Эффект препарата на показатели иммунной системы выясняли при сравнении с группой тревожно-депрессивных самцов, которым вводили физиологический раствор. Эффективность препарата выясняли при сравнении самцов с введением кломипрамина и контрольных особей.

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: вес органа в мг/вес тела в г. Количество ядросодержащих клеток в крови, суспензиях тимуса и селезенки подсчитывали в камере Горяева. Процентное соотношение субпопуляции лимфоцитов определяли методом проточной цитофлюориметрии.

В работе использовали моноклональные антитела (Pharming) против маркеров CD3, CD4 меченые флюоресцеином-5-изотиоцианатом и CD25, CD16/CD32, CD8, меченые фикоэритрином. Анализ проводили на проточном цитофлюориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США), используя программное обеспечение Cell Quest.

Активность дегидрогеназ лимфоцитов крови — сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) — определяли в мазках крови цитохимическим количественным методом с использованием п-нитротетразолия фиолетового [16].

Активность фермента оценивали по среднему количеству гранул формаза в 1 лимфоците. В каж-

дом мазке подсчитывали гранулы в 30 клетках. Анализ содержания клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла в исследуемых органах проводили с помощью метода проточной цитофлуориметрии с применением ДНК-специфичного красителя — йодистого пропидия [17] с использованием цитофлуориметра FACSCalibur (Becton Dickinson, фильтр 585/42).

Данные приводятся в виде процентного соотношения клеток от их общего количества в пробе. Были выделены: клетки в фазе G_0/G_1 — фаза покоя; клетки, находящиеся в состоянии пролиферации (синтетическая фаза S, постсинтетическая и митотическая фазы G_2/M), а также гиподиплоидные клетки, большинство из которых находится в состоянии апоптоза (A_0). В таблице приведен суммарный процент пролиферирующих клеток ($S+G_2/M$).

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Проверка нормальности распределения количественных признаков была проведена с использованием критерия Шапиро—Уилка (Shapiro—Wilk's W-test). Поскольку подавляющее большинство исследованных показателей удовлетворяло гипотезе о нормальном распределении, были использованы методы параметрической статистики.

Статистическую обработку параметрических данных по клеточному циклу проводили с помощью двухфакторного анализа (ANOVA) с целью выявления влияния фактора «органы» (тимус, селезенка) и фактора «стресс» (интактные и стрессированные самцы, после периода относительного покоя) и их взаимодействия, а также влияние фактора «органы» и фактора «препарат» (физиологический раствор и кломипрамин) и их взаимодействия.

Для показателей % лимфоцитов разных типов в тимусе или селезенке, а также для показателей активности ЛДГ и СДГ использовали однофакторный анализ (ANOVA) с фактором «экспериментальная группа», далее «группа» (контроль, самцы с введением физиологического раствора и самцы с введением кломипрамина).

Для парных сравнений экспериментальных групп был использован t-критерий Стьюдента при уровне значимости $p \leq 0,05$, и на уровне тенденции $0,05 < p < 0,1$.

Анализ данных производился с помощью пакета программы Statistica 6.0. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. В группах было 6—8 животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние кломипрамина на весовой индекс органов и количество клеток в тимусе, селезенке и крови у тревожно-депрессивных самцов мышей

ANOVA выявил достоверное влияние фактора «группа» для индекса селезенки ($F(2,19) = 5,24$; $p < 0,015$), клеточности крови ($F(2,20) = 5,04$; $p < 0,017$) и тимуса ($F(2,18) = 7,23$; $p < 0,005$). Парные сравнения групп показали повышенное количество лейкоцитов в крови у тревожно-депрессивных животных по сравнению с интактным состоянием (контролем) ($p < 0,049$) и достоверное снижение этого показателя под влиянием кломипрамина по сравнению с тревожно-депрессивными самцами, которым вводили физиологический раствор ($p < 0,016$) (табл. 1). В то же время, количество тимоцитов у тревожно-депрессивных животных было ниже, чем в контроле, и не изменилось существенно под влиянием препарата (по отношению к контролю $p < 0,006$ и $p \leq 0,05$, соответственно). По отношению к контролю весовой индекс селезенки у тревожно-депрессивных животных был повышен ($p < 0,018$), под влиянием препарата он несколько снизился и уже не отличался от контрольного состояния ($p > 0,05$).

Таким образом, в период относительного отдыха от агонистических взаимодействий, в течение которого мыши получали инъекции физиологического раствора, не произошло нормализации общего количества клеток в тимусе. Причем, хроническое введение кломипрамина не оказало существенного воздействия на этот показатель. В то же время повышенный уровень содержания лейкоцитов в крови и весовой индекс селезенки у тревожно-депрессивных мышей после воздействия препаратом приблизились к контрольному уровню.

Влияние кломипрамина на процентное соотношение клеток в различных фазах клеточного цикла у депрессивных животных в тимусе и селезенке

ANOVA выявил: достоверное фактора «органы» для клеток, находящихся в состоянии апоптоза (фаза A_0) ($F(1,27) = 33,87$; $p < 0,0001$); для покоящихся клеток (фаза G_0/G_1) влияние фактора «органы» ($F(1,27) = 4,64$; $p < 0,040$) и влияние фактора «стресс» ($F(1,27) = 8,71$; $p < 0,006$); для проли-

Табл. 1

Влияние кломипрамина на лейкоцитоз крови, клеточность и весовой индекс тимуса и селезенки у мышей

Параметры	Контроль	Тревожно-депрессивные мыши	
		физиологический р-р	кломипрамин
Вес тела, г	27,33 ± 0,35	27,83 ± 0,90	26,53 ± 0,61
Количество лейкоцитов крови, 10 ⁶ /мл а	0,94 ± 0,20	1,74 ± 0,31*	0,77 ± 0,12#
Весовой индекс тимуса	1,29 ± 0,13	0,97 ± 0,16	1,40 ± 0,10
Количество тимоцитов, 10 ⁶ аа	500,79 ± 94,42	187,31 ± 37,65**	267,75 ± 29,55*
Весовой индекс селезенки а	4,53 ± 0,30	9,33 ± 1,77*	5,09 ± 0,68
Количество спленоцитов, 10 ⁶	470,16 ± 77,07	339,94 ± 71,82	339,26 ± 66,50
Число мышей	8	8	6

Примечание : * — $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем (интактные), # — $p < 0,05$, по сравнению с тревожно-депрессивными самцами после введения физиологического раствора, t-критерий; а — $p < 0,05$, аа — $p < 0,01$, влияние фактора «группа».

ферлирующих клеток ($S+G_2/M$) влияние фактора «органы» ($F(1,27) = 11,95$; $p < 0,002$) и влияние фактора «стресс» ($F(1,27) = 7,08$; $p < 0,013$). Не было обнаружено влияния взаимодействия этих факторов для всех типов клеток.

При изучении эффекта кломипрамина на клеточный цикл тимоцитов и спленоцитов ANOVA у тревожно-депрессивных мышей выявил достоверное взаимодействие фактора «органы» для клеток в фазе A_0 ($F(1,25) = 12,80$; $p < 0,001$). Для клеток в фазах G_0/G_1 и $S+G_2/M$ не было показано влияния факторов «органы» и «препарат», но было обнаружено их взаимодействие: ($F(1,25) = 5,67$; $p < 0,025$) и ($F(1,25) = 4,79$; $p < 0,038$), соответственно.

В противоположность тимусу, в селезенке тревожно-депрессивных самцов, которым вводили физиологический раствор, % спленоцитов в фазе G_0/G_1 был существенно больше, а % пролиферирующих клеток ниже по отношению к контролю. Хронически вводимый в период отдыха от агонистических взаимодействий кломипрамин, привел к нормализации процентного соотношения спленоцитов, находящихся в различных фазах клеточного цикла.

Таким образом, процессы апоптоза и пролиферации идут по-разному в тимусе и селезенке и социальный стресс и кломипрамин также по-разному влияют на эти процессы в каждом органе. В тимусе, если изменения в процентном соотноше-

нии клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла и возникали при развитии тревожно-депрессивного состояния, развивающегося под влиянием социального стресса в течение 20 дней, то в период двухнедельного отдыха, несмотря на ежедневные инъекции физиологического раствора, происходило их полное восстановление. В селезенке процессы клеточного деления нормализовались только после применения кломипрамина.

Влияние кломипрамина на процентное соотношение субпопуляций лимфоцитов у тревожно-депрессивных животных в тимусе и селезенке

В тимусе ANOVA выявил достоверное влияние фактора «группа» для % $CD 8^+4^+$ ($F(2,20) = 5,83$; $p < 0,010$), % $CD 8^-4^+$ ($F(2,20) = 7,44$; $p < 0,004$) и для % $CD 3$ ($F(2,20) = 3,4$; $p \leq 0,05$). Парные сравнения экспериментальных групп показали более низкий % $CD 4^+8^+$ у тревожно-депрессивных животных, которым в период относительного отдыха вводили физиологический раствор ($p < 0,004$), без существенного изменения этого показателя после введения кломипрамина ($p < 0,019$) по отношению к контролю (табл. 2). % $CD 3$ после введения препарата был значительно ниже по отношению к контролю ($p < 0,05$) В то же время % $CD 8^-4^+$ был

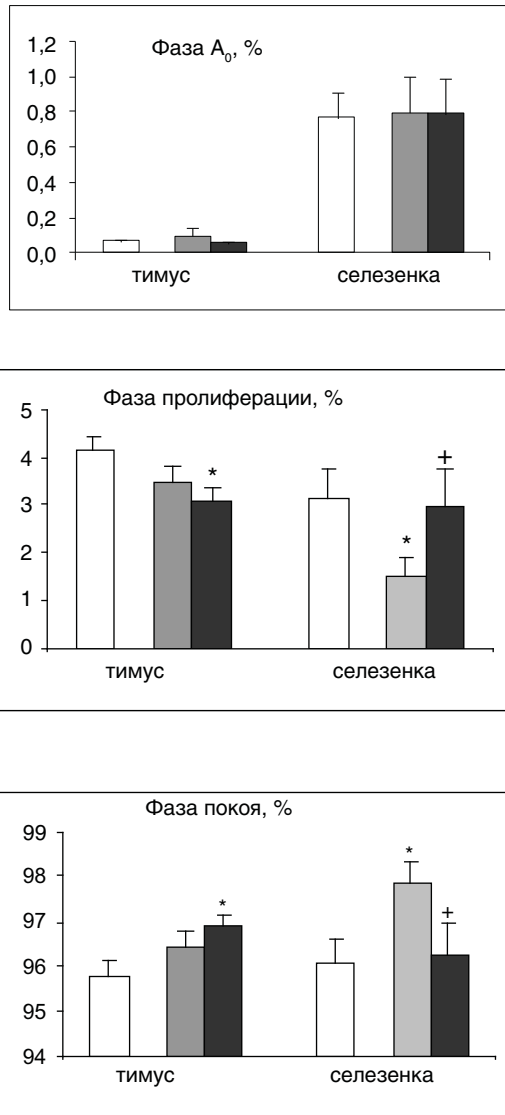


Рис. 1

Влияние кломипрамина на процентное соотношение клеток в разных фазах клеточного цикла у тревожно-депрессивных животных в тимусе и селезенке

Белые столбы — контроль; серые столбы — тревожно-депрессивные самцы после введения физиологического раствора, черные столбы — тревожно-депрессивные самцы после введения кломипрамина; * — $p < 0,05$; по сравнению с контролем (интактные), † — $p < 0,05$, по сравнению с самцами после введения физиологического раствора, t-критерий.

выше у тревожно-депрессивных самцов с введением физиологического раствора ($p < 0,003$) и оставался все еще повышенным у животных, которым вводили кломипрамин ($p < 0,004$).

В селезенке ANOVA выявил достоверное влияние фактора «группа» для % $CD4^+8^-$ ($F(2,20) = 15,3$; $p < 0,0001$), % $CD8^+4^+$ ($F(2,20) = 5,72$; $p < 0,011$), $CD16/32^+$ ($F(2,20) = 10,91$; $p < 0,001$), для % $CD3^+$ ($F(2,20) = 4,41$; $p < 0,026$) для % $CD19^+$ ($F(2,20) = 4,84$; $p < 0,019$). Парные сравнения экспериментальных групп показали более низкий % $CD4^+8^-$ у тревожно-депрессивных животных с введением физиологического раствора ($p < 0,004$), который все еще оставался сниженным после введения кломипрамина по отношению к контролю ($p < 0,001$) (табл. 2).

Существенное снижение % $CD4^+8^+$ произошло под влиянием кломипрамина как по отношению к депрессивным животным, которым вводили физиологический раствор ($p < 0,014$), так и по отношению к контролю ($p < 0,005$). Сходное снижение у депрессивных животных с введением физиологического раствора наблюдалось и для % $CD19^+$, причем кломипрамин также не имел существенно воздействия ($p < 0,001$ и $p < 0,030$, соответственно). Аналогичные соотношения были установлены для % $CD3^+$ ($p < 0,007$ и $p \leq 0,05$) по сравнению с контролем.

В то же время у тревожно-депрессивных животных, которым вводили физиологический раствор, % $CD16/32^+$ был выше, чем у контрольных животных ($p < 0,0001$), и все еще оставался повышенным ($p < 0,004$) после введения кломипрамина по отношению к контролю.

Таким образом, у тревожно-депрессивных животных в период относительного отдыха, в течение которого агонистические взаимодействия были прекращены, не произошло нормализации субпопуляционного состава лимфоцитов в тимусе и селезенке, и кломипрамин имел незначительный эффект.

Влияние кломипрамина на активность лактатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови у тревожно-депрессивных животных

ANOVA выявил достоверное влияние фактора «группа» на активность СДГ ($F(2,20) = 6,39$; $p < 0,007$) и ЛДГ ($F(2,20) = 17,7$; $p < 0,0001$) в лимфоцитах крови. Парные сравнения групп выявили более низкую активность СДГ и ЛДГ у тревожно-депрессивных животных с введением физи-

Табл. 2

Влияние кломипрамина на субпопуляционный состав лимфоцитов в тимусе и селезенке мышей

Органы	Контроль	Тревожно-депрессивные мыши	
		физиологический р-р	кломипрамин
тимус			
CD 8 ⁺ 4 ⁻	2,31 ± 0,19	3,25 ± 0,59	2,41 ± 0,34
CD 8 ⁺ 4 ⁺ aa	87,18 ± 0,51	79,23 ± 2,25**	82,41 ± 1,83*
CD 8 ⁻ 4 ⁺ aa	7,04 ± 0,42	12,47 ± 1,42**	10,69 ± 1,00**
CD 3 a	92,46 ± 0,64	90,67 ± 0,59	90,02 ± 0,84*
CD16/32 ⁺	0,40 ± 0,08	0,61 ± 0,11	0,51 ± 0,08
селезенка			
CD 4 ⁺ 8 ⁻ aaa	19,80 ± 0,58	14,26 ± 0,71**	14,81 ± 1,08***
CD 4 ⁺ 8 ⁺ aa	1,17 ± 0,13	1,14 ± 0,16	0,58 ± 0,11**#
CD 8 ⁺ 4 ⁻	14,55 ± 0,81	13,78 ± 0,77	13,26 ± 1,01
CD16/32 ⁺ aaa	12,49 ± 1,19	23,41 ± 1,82***	20,90 ± 2,24**
CD 3 ⁺ a	34,76 ± 0,99	29,10 ± 1,48**	30,58 ± 1,78
CD 19 ⁺ a	50,68 ± 1,14	42,07 ± 1,78***	41,71 ± 3,72*
Число мышей	8	8	7

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем (интактные), # $p < 0,05$, по сравнению с тревожно-депрессивными самцами после введения физиологического раствора, t-критерий; влияние фактора «группа»: a — $p < 0,05$, aa — $p < 0,01$, aaa — $p < 0,001$.

ологического раствора по сравнению с контрольным состоянием (для обеих $p < 0,001$), которая повышалась после введения кломипрамина (на уровне тенденции для СДГ и $p < 0,005$ для ЛДГ) (рис. 2), отличаясь все же от контрольных значений активности ЛДГ ($p < 0,019$).

Повышение активности СДГ и ЛДГ лимфоцитов крови под влиянием кломипрамина можно расценивать как признаки активации клеток иммунной системы.

ОБЩЕЕ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано [1, 2], что хронический социальный стресс вызывает развитие тревожно-депрессивного состояния у самцов мышей, сопровождающегося нарушением субпопуляционного состава лимфоцитов [5, 12], свидетельствующего о супрессии клеточного и гуморального иммунитета, и изменением клеточной пролиферации и апоптоза в органах иммунной системы [11]. Так, наибольшие изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов

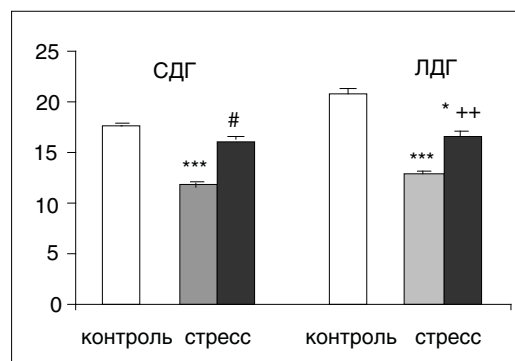


Рис. 2

Влияние кломипрамина на активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в лимфоцитах крови у тревожно-депрессивных животных

Серые столбы — тревожно-депрессивные самцы после введения физиологического раствора, черные столбы — депрессивные самцы после введения кломипрамина; *** — $p < 0,001$; по сравнению с контролем (интактные), ++ — $p < 0,01$, по сравнению с тревожно-депрессивными самцами после введения физиологического раствора, t-критерий

происходили в селезенке, в которой наблюдалось снижение числа CD4⁺8⁻, CD4⁻8⁺, CD16/32⁺, CD19⁺. При этом было нарушено соотношение клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла: в тимусе произошло снижение % пролиферирующих клеток и увеличение % клеток в состоянии покоя. В селезенке, наоборот, процент пролиферирующих клеток стал больше, но при этом снизилось содержание клеток в состоянии покоя и апоптоза. Анксиолитик диазепам, хронически вводимый на фоне социального стресса, предотвращал развитие тревоги [10], что ассоциировалось с нивелированием большинства изменений в клеточном составе органов иммунной системы [12].

В этом эксперименте показано, что после двухнедельного периода отдыха от агонистических взаимодействий не наблюдается нормализации клеточного состава органов иммунной системы по многим показателям: количество тимоцитов было ниже, а весомой индекс селезенки повышен по отношению к контрольному состоянию. По отношению к контролю было снижено процентное содержание CD8⁺4⁺ тимоцитов и CD8⁺4⁻, CD3⁺ и CD19⁺ спленоцитов и повышено процентное содержание CD8⁻4⁺ тимоцитов и CD16/32⁺ спленоцитов. Так как клетки CD8⁺4⁺ являются малодифференцированными [18], можно говорить о нарушении процессов центральной дифференцировки Т-лимфоцитов. Снижение содержания Т- и В-клеток в селезенке (CD3⁺ и CD19⁺), по-видимому, свидетельствует о снижении клеточного и гуморального иммунитета, которые длительно сохраняются. Однако повышение процентного содержания клеток с фенотипом CD16/32⁺ в селезенке можно считать благоприятным признаком, так как данные клетки включают популяции моноцитов/макрофагов и НК-клеток (натуральных киллеров), обладающих противоопухолевой и противовирусной активностью, в то время как снижение численности и функциональной активности субпопуляции НК является характерным признаком иммунных нарушений при депрессии и стрессе [5, 19].

Таким образом, полученные данные в дополнение к установленным ранее фактам [5, 12], говорят о том, что социальный стресс приводит к существенному дисбалансу в иммунной системе с признаками развития иммунодефицитного состояния. Даже при отсутствии сильного психотравмирующего воздействия, который вызывался ранее ежедневным стрессом социальных поражений с сильным и агрессивным партнером, клеточный состав лимфоидных органов не возвращается полностью к норме. Нужно отметить, что после этих 2-х недель относительного отдыха, в который были прекращены агонистические взаимодействия, но все же ежедневно

вводился физиологический раствор, содержание клеток в разных фазах клеточного цикла в тимусе практически не отличались от контроля. Однако в селезенке % покоящихся клеток был больше, а пролиферирующих меньше по отношению к контрольному состоянию.

Хотелось бы обратить внимание на то, что наблюдается противоположная динамика изменений пролиферативного потенциала клеток тимуса и селезенки сразу после стресса социальных взаимодействий и после периода относительного покоя. Через 20 дней агонистических взаимодействий, как было показано нами ранее [11], у тревожно-депрессивных самцов в тимусе наблюдается увеличение клеток в состоянии покоя и снижение пролиферирующих клеток. После двухнедельного периода отдыха, несмотря на ежедневные инъекции физиологического раствора, как показано в данном эксперименте, этот дисбаланс возвращается практически к норме. В селезенке, наоборот, наблюдалось увеличение % пролиферирующих клеток и снижение % покоящихся клеток в процессе развития депрессии под влиянием социального стресса. После периода отдыха, во время которого мыши получали инъекции физиологического раствора, эти изменения приобретают противоположный характер — снижается % пролиферирующих клеток и увеличивается % покоящихся клеток. Вероятно, что запущенный процесс восстановления клеточной пролиферации спленоцитов к норме, через две недели переживает обратную динамику.

Нужно отметить, что психоэмоциональный статус (в частности, высокий уровень тревожности) не возвращается к норме у тревожно-депрессивных самцов после 2-х недельного отдыха [20]. Можно предполагать, что, по крайней мере, повышенная тревожность, изменения клеточного цикла и нарушение субпопуляционного состава лимфоцитов в органах иммунной системы являются взаимосвязанными процессами и имеют, возможно, общие звенья регуляции.

Как показали наши исследования, после введения кломипрамина у животных усилилось состояние тревоги, то есть кломипрамин оказал анксиогенный эффект, но в то же время у них снималось депрессивно-подобное состояние [14]. При этом введение препарата не привело к нормализации дисбаланса в субпопуляционном составе лимфоцитов как в тимусе, так и в селезенке, возникших под влиянием хронического социального стресса и сохранившихся в течение периода относительного покоя. Наши результаты согласуются с данными авторов [21], которые не нашли различий в субпопуляционном составе лимфоцитов крови до и после применения кломипрами-

на у пациентов с навязчивыми расстройствами и с повышенной тревожностью.

В то же время, в селезенке % покоящихся и пролиферирующих клеток после хронического введения антидепрессанта уже не отличались от контрольного состояния. То есть, кломипрамин привел к нормализации процессов клеточного деления спленоцитов. Можно предполагать, что под влиянием кломипрамина происходит стимуляция процесса деления клеток в селезенке, поскольку процентное содержание спленоцитов в фазе G_2/M у тревожно-депрессивных самцов с введением физиологического раствора было ниже нормы, а после применения препарата оно уже не отличалось от контроля. В тимусе наоборот, процентное содержание клеток в фазе G_2/M снижалось ниже контрольного уровня.

Таким образом, кломипрамин оказал разнонаправленное влияние на пролиферацию клеток тимуса и селезенки. Объяснением этому отчасти могут служить данные о том, что центральные и периферические органы иммунитета находятся под контролем разных нейроэндокринных осей. Полагают, что серотонин влияет на иммунную систему через ось гипоталамус—гипофиз—надпочечники, а дофамин через ось гипоталамус—гипофиз—тимус [22]. Надо сказать, что и серотонин, и дофамин напрямую вовлечены в формирование тревожно-депрессивного состояния у самцов мышей. У животных, находящихся в стадии глубокой депрессии, активность и серотонергической и дофаминергических систем мозга снижена [1, 2].

Кломипрамин повышает функциональную активность этих медиаторных систем [9]. Полагают также, что его иммуномодулирующие эффекты реализуются с участием катехоламинов и/или серотонина [23]. Кроме того, кломипрамин может снижать концентрацию кортикостероидов в плазме крови в ситуации стресса [24]. Есть данные о прямом влиянии препарата на пролиферацию и апоптоз нормальных крысиных спленоцитов *in vitro* [25], а также о редукции глюкокортикоидных рецепторов на лимфоцитах крови людей [26]. Возможно, что стимуляция пролиферации спленоцитов под влиянием кломипрамина связана со снижением антипролиферативного действия глюкокортикоидных гормонов, как за счет снижения их количества, так и за счет модификации рецепторов к ним [26] на клетках селезенки.

Восстанавливающий эффект кломипрамина был продемонстрирован на активности ЛДГ и СДГ в лимфоцитах крови. Сниженная активность этих ферментов в группе тревожно-депрессивных мышей увеличивалась под влиянием антидепрессанта.

Если сопоставить эффекты хронического введения диазепама, который, оказывая выраженный анксиолитический эффект [10], купирует влияние длительного социального стресса на показатели клеток иммунной системы [17], можно сделать вывод о том, что именно выраженная тревога, развивающаяся у животных в этих условиях, может являться этиологическим патогенным фактором, формирующим иммунодефицитное состояние с изменением субпопуляционного состава лимфоцитов и нарушением клеточного цикла в иммунокомпетентных органах. И в нашем эксперименте, именно высокий уровень тревоги, вызванный введением кломипрамина, препятствует восстановлению дисбаланса в субпопуляционном составе лимфоцитов, а значит и в функциональном состоянии иммунной системы. В то же время можно думать, что антидепрессивный эффект препарата, который, скорее всего обусловлен активацией норадренергической системы, обеспечивает его позитивный эффект на некоторые показатели иммунной системы (лейкоцитоз крови, вес селезенки, пролиферативную активность спленоцитов).

В настоящее время трудно обозначить пути, по которым препараты, оказывая психотропное воздействие, влияют на функциональное состояние иммунокомпетентных клеток. Видимо, необходим детальный поиск по 2-м направлениям: исследование их влияния на нейроэндокринный и психоэмоциональный статус и изучение прямого действия на иммунокомпетентные клетки. Однако вычленивать эти механизмы *in vivo* в конкретной экспериментальной ситуации пока не представляется возможным.

Нет ответа и на вопрос какова последовательность событий, вовлекающих разные звенья иммунитета при воздействии хронического социального стресса и коррекции его влияния психотропными препаратами. Очевидно, что это должно быть напрямую связано с теми нейрохимическими процессами, которые вовлечены в механизмы формирования тревоги и депрессии и в механизмы иммунотропного действия препаратов. Являются ли эти процессы взаимосвязанными, или препараты могут иметь различные пути воздействия на характеристики иммунокомпетентных клеток и психоэмоциональное состояние, предстоит еще исследовать.

Однако можно утверждать, что адекватная коррекция психоэмоционального расстройства может привести и к нормализации иммунного статуса. Становится очевидной необходимость разработки комплексных методов коррекции иммунопатологических состояний на фоне повышенной тревожности с включением антидепрессивных и анксиолитических препаратов.

Исследование проведено при поддержке программами РАН «Фундаментальные науки — медицине», (рук. акад. А.И. Григорьев) — А.И.5.14 и «Молекулярная и клеточная биология» (рук. акад. Г.П. Георгиев) — А.И.6.16.

ЛИТЕРАТУРА

1. Августинович Д.Ф., Алексеенко О.В., Бакштановская И.В., Корякина Л.А., Липина Т.В., Тендитник М.В., Бондарь Н.П., Коваленко И.Л., Кудрявцева Н.Н. Динамические изменения серотонергической и дофаминергической активности мозга в процессе развития тревожной депрессии: экспериментальное исследование. Усп физиол наук. 2004; 35(4): 19–40.
2. Kudryavtseva N.N., Avgustinovich D.F. Behavioral and physiological markers of experimental depression induced by social conflicts (DISC). *Aggress Behav.* 1998; 24: 271–286.
3. 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.* 1993; 7: 91–96.
4. Fano E., Sanchez-Martin J.R., Arregi A., Castro B., Alonso A., Brain P., Azpiroz A. Social stress paradigms in male mice: variations in behavior, stress and immunology. *Physiol Behav.* 2001; 73: 165–173.
5. 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. *Росс физиол журн им И.М. Сеченова.* 2004; 12: 1522–1529.
6. Попова Н.А., Ильницкая С.И., Колесникова Л.А., Каледин В.И., Кудрявцева Н.Н. Влияние хронических социальных конфликтов на некоторые показатели неспецифической резистентности у мышей. *Росс физиол журн им И.М. Сеченова.* 1996; 82(12): 14–19.
7. Каледин В.И., Тендитник М.В., Николин В.П., Попова Н.А., Кудрявцева Н.Н. Влияние психоэмоционального состояния на рост и метастазирование опухоли Льюис у мышей. *Докл биол наук.* 2006; 406: 57–59.
8. Kudryavtseva N.N., Tenditnik M.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Kaledin V.I. The influence of psychoemotional status on metastasis of Lewis lung carcinoma and hepatocarcinoma-29 in mice of C57BL/6J and CBA/Lac strains. *Exp Oncol.* 2007; 29(1): 35–38.
9. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М., 2008. 1216 с.
10. Коваленко И.Л., Кудрявцева Н.Н. Развитие симптомов аутистического спектра под влиянием хронического социального стресса у тревожных самцов мышей: влияние диазепама. *Психофармакол биол наркол.* 2010; 10(1–2): 2624–2635.
11. 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. *Бюлл эксперим биол мед.* 2011 (в печати).
12. 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. *Бюлл СО РАМН.* 2010; 30(4): 46–50.
13. Kaledin V.I., Il'nitskaya S.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Smagin D.A., Kudryavtseva N.N. Limiting effect of diazepam on Lewis Lung carcinoma metastasis in anxious male mice. *Exp Oncol.* 2009; 1: 62–64.
14. 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. *Психофармакол биол наркол.* 2011; 11(1–2): 2666–2676.
15. Kudryavtseva N.N. Sensory contact model: Protocol, control, applications. / Ed. N.N. Kudryavtseva. New York: NOVA Science Publishers Inc., 2010. 48 pp.
16. Меркурьева А.В., Билич Г.Л., Нарциссов Р.П. Биохимические и цитохимические методы определения активности ферментов и фермент-субстратных систем различной клеточной локализации. *Методические рекомендации.* Москва–Йошкар-Ола, 1982.
17. 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 ID PP000002400. *Anal Biochem.* 2008. 382(2): 87–93. http://www.protocol-online.org/cgi-bin/prot/view_cache.cgi?ID=172.
18. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы. СПб., 2001. 390 с.
19. Boscolo P., Di Donato A., Di Giampaolo L., Forcella L., Reale M., Dadorante V., Alparone F., Pagliaro S., Kouri M., Magrini A., Fattorini E. Blood natural killer activity is reduced in men with occupational stress and job insecurity working in a university. *Int Arch Occup Environ Health.* 2009; 82(6): 787–794.
20. Avgustinovich D.F., Kovalenko I.L., Kudryavtseva N.N. A model of anxious depression: persistence of behavioral pathology. *Neurosci Behav Physiol.* 2005; 9: 917–924.
21. Barber Y., Toren P., Achiron A., Noy S., Wolmer L., Weizman R., Laor N. T cell subsets in obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology.* 1996; 34(2): 63–66.
22. Девойно Л.В., Ильюченко Р.Ю. Нейромедиаторные системы в психонейроиммунотуляции: Допамин, серотонин, ГАМК, нейропептиды. Новосибирск: ЦЭРИС, 1993. 240 с.
23. Zhu J., Bengtsson B.O., Mix E., Ekerling L., Thorell L.H., Olsson T., Link H. Clomipramine and imipramine suppress clinical signs and T and B cell response to myelin proteins in experimental autoimmune neuritis in Lewis rats. *J Autoimmun.* 1998; 11(4): 319–327.
24. Frank D., Gauthier A., Bergeron R.. Placebo-controlled double-blind clomipramine trial for the treatment of anxiety or fear in beagles during ground transport. *Can Vet J.* 2006; 47(11): 1102–1108.
25. Taler M., Bar M., Korob I., Lomnitski L., Baharav E., Grunbaum-Novak N., Weizman A., Gil-Ad I. Evidence for an inhibitory immunomodulatory effect of selected antidepressants on rat splenocytes: possible relevance to depression and hyperactive-immune disorders. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8(4): 526–533.
26. Carvalho L.A., Juruena M.F., Papadopoulou A.S., Poon L., Kerwin R., Cleare A.J., Pariante C.M. Clomipramine in vitro reduces glucocorticoid receptor function in healthy subjects but not in patients with major depression. *Neuropsychopharmacology.* 2008; 33(13): 3182–3189.

Kudryavtseva NN¹, Smagin DA¹, Galyamina AG¹, Shurlygina AV², Melnikova EV², Tenditnik MV², Panteleeva NG², Trufakin VA.² [Effects of clomipramine on changes in subpopulations of lymphocytes and cell cycle arrest in the thymus and spleen, arising under chronic social defeat stress in anxious-depressive male mice]. *Psychopharmacol Biol Narcol.* 2011; 11(1–2): 2677–2687. Epub 14 June 2011. Russian

¹Institute of Cytology and Genetics SD RAS, Neurogenetics of Social Behavior Sector; 10, Acad. Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090, Russia, Tel.: +7 383-363-49-65

²Institute of Clinical and Experimental Lymphology SB RAMS; 2, Timakova Str., Novosibirsk, 630117, Russia, Tel.: +7 383-335-95-31

CITATION: PSYCHOPHARMACOL BIOL NARCOL. 2011; 11(1–2): 2677–2687. EPUB 2011 JUN 14. RUSSIAN

ABSTRACT

BACKGROUND. Chronic social defeat stress leads to development of mixed anxiety-depression state, which accompanied by immune suppression in male mice. Paper aimed to study effects of clomipramine on changes in subpopulations

of lymphocytes and cell cycle arrest in the thymus and spleen in depressive male mice.

METHODS. Clomipramine (40 mg/kg, i/p) and saline were chronically injected to depressive mice during 2 weeks without agonistic interactions. Percentages of resting, proliferating and apoptotic cells, subpopulations of lymphocytes in the thymus and spleen, as well as lactate dehydrogenase and succinate dehydrogenase activities in blood lymphocytes were studied.

RESULTS. Clomipramine did not normalize changes in % of lymphocytes subpopulations changed under chronic social defeat stress in the thymus and spleen. In the thymus cell cycle arrest and apoptosis arisen under social defeat stress fully restored during resting period. Clomipramine restored process of proliferations in the spleen. Lactate dehydrogenase and succinate dehydrogenase activities of lymphocytes under clomipramine treatment were similar with level in the control mice.

CONCLUSION. Clomipramine partly restored immune deficiency in depressive male mice. Association between cellular immune deficiency and chronic anxiety developing under chronic social defeat stress is considered.

KEY WORDS: Chronic social defeat stress; Mixed anxiety-depression state; Clomipramine; Subpopulations of lymphocytes; Cell cycle

2687

Correspondence to: Natalia N. Kudryavtseva
Institute of Cytology and Genetics SD RAS
10, Acad. Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090, Russia
e-mail: n.n.kudryavtseva@gmail.com

Epub 2011 Jun 14. In Russian © PPBN
<http://www.psychopharmacology.ru/index.php/PPBN/article/view/1051>
<http://www.eLibrary.ru>