

УДК 612.766.1; 612.015.3

**ВЛИЯНИЕ МОНОНУКЛЕАРОВ НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ
В РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ****Капышева У.Н., Бахтиярова Ш.К., Баимбетова А.К.,
Жаксымов Б.И., Крганбаева А.С.***РГП «Институт физиологии человека и животных» КН МОН РК, Алматы, e-mail: unzira@inbox.ru*

Исследование поведенческих реакций в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» показало снижение двигательной активности животных и рост уровня тревожности (увеличение времени груминга, числа болосов и реверсов) на 30–60 сут после введения аллогенных моноклеарных клеток, взятых у юных крыс-доноров. На 90 сут наблюдений поведенческие реакции животных соответствовали контрольным данным. Исследование когнитивной функции животных в тесте «Водный лабиринт Морриса» на 90 сут после трансплантации МНК показало значительное улучшение функций интегративной деятельности стареющего мозга – старые крысы были активнее в нахождении постоянного места расположения платформы и проявили сохранность памятных следов в ситуации случайного положения платформы, также обострились внимательность и образная память животных.

Ключевые слова: поведение, когнитивные функции, моноклеары**INFLUENCE OF MONONUKLEAROV ON KOGNITIVNYE FUNCTIONS
IN DIFFERENT TERMS AFTER TRANSPLANTATION****Kapysheva U.N., Bakhtiyarova S.K., Baimbetova A.K., Zhaksymov B.I., Korganbaeva A.S.***Institute of Human and Animal Physiology, Almaty, e-mail: unzira@inbox.ru*

Research in behavioral tests «open field» and «Raised krestooobrazny labyrinth» showed a decrease in the motor activity of animals and increase the level of anxiety (increased grooming time, the number of boluses and reverse) 30–60 days after administration of allogeneic mononuclear cells from young rat. In the 90 days of observation behavioral responses of animals comply with the control data. The study of cognitive function in test animals «Morris's labyrinth» at 90 days after transplantation of MNCs showed a significant improvement in the functions of integrative activity of brain aging – old rats were more active in finding a permanent location platform and demonstrated the safety of memorable tracks in a random situation, the Platform also intensified care and shape memory of the animals.

Keywords: behavior, cognitive function, mononuclear cells

Влияние моноклеаров на организм в отдаленные сроки после трансплантации изучено крайне недостаточно, поэтому исследования в данной области обладают высокой практической значимостью и научной новизной и требуют глубоких фундаментальных исследований [1, 4, 5, 6, 7]. Большое значение играет фактор генетической предрасположенности вводимых СК – донорские клетки (аллогенные) или свои (аутологичные). Конечно, введение аутологичных клеток более безопасно и физиологически оправданно [4–7, 9, 10]. Однако и потребность в донорских клетках очень высока в силу различных причин – болезнь или срочность трансплантации. При этом до сих пор неясно, какую роль играет возраст донорского костного аспирата, как влияет трансплантация МНК, взятых из костного аспирата юных крыс, на возрастные особенности когнитивной функции стареющих животных в возрасте 12 мес., 18 мес., 24 мес.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 135 взрослых белых лабораторных крысах массой 220–300 г. Для выделения моноклеарной фракции из костного

аспирата были взяты в острый опыт 30 крыс-доноров в возрасте 3 мес. Опытные животные были разделены на 3 возрастные группы, а также по периодам наблюдений после введения МНК.

Исследования выполнены в соответствии с правилами содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами, изложенными в книге «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» (Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации, Минск, 2014).

Методы оценки когнитивной функции у стареющих крыс. Методика «открытое поле» (ОП) позволяет исследовать врожденные особенности ориентировочно-исследовательского поведения и резистентности к стрессу по Холлу [2]. Для исследований применяли стандартную установку «Открытое поле», производство ООО «НПК Открытая наука», которая представляла собой круглую арену диаметром 97 см, с высотой стенок 42 см, диаметр отверстий в полу 2 см, разделенная на 12 периферических и 7 центральных квадратов

В ОП оценивали:

1) ориентировочно-исследовательскую реакцию (ОИР) по числу пересеченных квадратов по периметру, по числу заглядываний в дырки, по числу вертикальных стоек (вертикальная двигательная активность, ВДА);

2) эмоциональную реакцию – по числу пересеченных квадратов в центре поля, времени нахождения в центральных квадратах ($T_{ц}$); о ярком выраже-

нии пассивного страха судили по частоте груминга и количеству болюсов.

Метод исследования образной долгосрочной памяти по тесту Морриса (водный лабиринт). Установка для пространственного обучения представляла собой заполненный водой круглый бассейн из светлого пластика – диаметром 150 см, высотой 50 см, на краю которого помещали платформу, высота которой была ниже уровня воды на 8 см. Для скрытия местонахождения платформы в воду добавляли молоко. Крыс выпускали в бассейн из разных (четыре) точек по периметру. После того как крыса отыскивала платформу (либо плавала в течение 2 минут), ее вынимали из бассейна. Исследования в бассейне проводили в течение 5 дней по 3 предъявления в день. Положение подводной платформы сохраняли постоянным в течение четырех опытных дней, после чего на 5й день платформу помещали в другие разные квадраты бассейна. При перемене положения платформы время, которое животное проводило, плавая над старым местоположением платформы, считали показателем прочности следа образной памяти [3].

Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). Для исследований использовали стандартную установку «ПКЛ», производство ООО «НПК Открытая наука». Это приподнятый над полом лабиринт с двумя открытыми и двумя закрытыми рукавами. Методика ПКЛ предназначена для изучения поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности (при свободном выборе комфортных условий) и позволяет оценить: уровень тревожности животного (по предпочтению темноты/света, боязни высоты, выраженности и динамике поведения («выглядывания»)); симптомы неврологического дефицита; привыкание (habituation) [2].

Для получения моноклеарной фракции использовали аспират костного мозга бедренной кости 3х-мес крыс. Костный мозг заготавливали, аспирируя клетки из полостей трубчатых костей. Дальнейшее очищение состояло из удаления фрагментов кости фильтрацией и изоляции лейкоцитарного слоя (buffy-coat) после центрифугирования. Выделение моноклеарной фракции из донорского костного аспирата проводили по методу Youm [8]. Жизнеспособность клеток, определяемая по методу окрашивания с трипановым синим, в наших исследованиях составляла 86%. Полученную моноклеарную фракцию вводили однократно в хвостовую вену опытных крыс в дозе 200 000 клеток на крысу или 1 млн МНК на 1 кг веса.

Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel и изменения параметров с учетом непарного критерия Фишера – Стьюдента и считали достоверными при $p \leq 0,05$. Также использовали непарметрические тесты Манна-Уитни. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего, p – уровень значимости: $p \leq 0,05$ при сравнении всех групп с контрольной группой.

Результаты исследований и их обсуждение

Тестирование поведенческих реакций у крыс проводили через 30, 60 и 90 сут после введения аллогенных моноклеарных клеток, выделенных из аспирата костной ткани бедренной кости юных крыс-доноров.

Тест «Открытое поле». После введения МНК в тесте «открытое поле» снизилась двигательная активность животных, только

24-мес крысы на 60 сут после введения МНК достигли контрольных показателей (табл. 1).

Как видно из данных в табл. 2, высокая активность интактных животных в тесте ОП сменилась тенденцией к развитию пассивно-оборонительного поведения после введения МНК на протяжении всего периода наблюдений во всех группах. При этом отмечалось снижение уровня ориентировочно-исследовательской реакции, усиление страха перед освещенностью центральных квадратов, а также увеличение времени груминга, числа болюсов, реверсов и заглядываний в норки (табл. 1).

Такое состояние отражает нарастание тревожности после введения МНК – более выраженное на 30 сут, менее – на 90 сут, причем у молодых животных эмоциональное напряжение и способы его снятия – груминг, болюсы, реверсы, заглядывания в норки – использовались более активно.

Приподнятый крестообразный лабиринт [2]. Уровень тревожности в ПКЛ оценивали по числу заходов в открытые и закрытые рукава в течение 5 минут, числу свешиваний с рукавов и времени груминга. В числовом значении полученные данные приведены в табл. 2.

Как показано в табл. 2, поведение животных в тесте ПКЛ – число посещений открытых и закрытых рукавов, свешиваний с рукавов – практически оставалось на одном уровне, независимо от сроков тестирования, в то время как период груминга – показатель скрытой эмоциональной напряженности животных, значительно возрастал в закрытых рукавах.

В данной работе тест «Водный лабиринт Морриса» использовался для оценки когнитивной дисфункции крыс при старении [3]. Оценка возрастной когнитивной дисфункции в тесте «Водный лабиринт Морриса» проводилась через 30, 60 и 90 сут после введения МНК.

Исследование когнитивной деятельности животных разного возраста в разные сроки после введения аллогенных МНК показало улучшение пространственной ориентации животных в тесте Морриса через 90 сут после трансплантации МНК по сравнению с данными, полученными до введения МНК. Так, старые животные (24 мес.) показали минимальное время поиска скрытой платформы – 5–6 сек в среднем по группе. Тестирование через 14 сут показало сохранность пространственной ориентации при постоянном местонахождении платформы на 100% во всех группах животных. При смене местонахождения платформы время поиска на 14 сут было также минимальным по всем группам животных и составляло от 2 до 6 сек.

Таким образом, критерием нормально-го состояния когнитивных функций у контрольных крыс является достижение скрытой под водой платформы на 5 сут научения за 12 и менее секунд, при тесте на сохранность пространственной памяти – до 15 сек. После введения МНК на 90 сут животные достигали платформы при ее постоянном местоположении уже с 1 попытки первого опыта за 5–6 сек, при случайном положении – время поиска также составляло от 2 до 6 сек с 3-й попытки, во всех группах подопытных крыс выявлено уменьшение времени нахождения платформы в водном

лабиринте, сокращение длины траектории движения и времени пребывания возле стенок (тигмотаксис), а также увеличение скорости передвижения.

Исходя из этого, следует отметить, что трансплантация аллогенных мононуклеаров от юных крыс-доноров стареющим крысам обуславливает улучшение пространственной дифференцировки в условиях водного лабиринта Морриса, положительно влияет на состояние когнитивных функций, улучшает ориентацию в пространстве на 60–90 сут после введения МНК как у молодых, так и старых крыс.

Таблица 1

Показатели поведенческих реакций животных в тесте ОП в разные сроки после введения МНК

Показатель	Группа крыс по возрасту		
	12 мес.	18 мес.	24 мес.
контроль			
ДА	48,44 ± 5,31	46,36 ± 5,03	46,08 ± 3,72
ВА	6,13 ± 0,97	5,57 ± 0,56	4,84 ± 0,44
время в центре, сек.	15,00 ± 0,1	0	0
реверсы	2,19 ± 0,29	2,36 ± 0,33	3,09 ± 0,37
груминг, сек.	11,42 ± 0,56	13,93 ± 2,02	14,25 ± 2,67
болюсы, шт	1,33 ± 0,28	2,43 ± 0,62	2,50 ± 0,2
через 30 сут			
ДА	29,66 ± 1,9*	23,40 ± 0,6**	21,03 ± 4,7**
ВА	2,66 ± 0,3*	2,13 ± 1,7**	1,94 ± 0,3**
время в центре, сек.	0,44 ± 0,10*	0	0,33 ± 0,04
реверсы	3,11 ± 0,4	3,00 ± 1,0	2,78 ± 0,6
груминг, сек.	14,44 ± 4,7*	9,86 ± 2,2*	27,11 ± 2,8
болюсы	2,88 ± 0,3	2,53 ± 0,5	1,83 ± 0,6
заглядывания в норки	2,05 ± 2,6	1,66 ± 0,6	4,48 ± 0,2
через 60 сут			
ДА	27,58 ± 1,1	30,94 ± 3,7**	46,66 ± 8,7
ВА	8,58 ± 6,0*	2,99 ± 0,6**	4,05 ± 0,8
время в центре, сек.	1,16 ± 0,6*	0,88 ± 0,4	1,27 ± 0,4
реверсы	3,33 ± 1,12	3,32 ± 0,6	3,83 ± 1,0
груминг, сек.	30,66 ± 3,3*	21,88 ± 4,7**	14,65 ± 2,3*
болюсы, шт.	3,25 ± 0,5	2,16 ± 0,5	2,44 ± 1,24
заглядывания в норки	4,25 ± 0,8	5,55 ± 1,18	8,78 ± 3,7
через 90 сут			
ДА	18,54 ± 0,6**	19,58 ± 5,0**	41,33 ± 4,12
ВА	4,20 ± 0,8	3,16 ± 1,6**	3,83 ± 0,50
время в центре, сек.	0	0	0
реверсы	1,74 ± 0,1	1,83 ± 0,3	1,82 ± 0,1
груминг, сек.	13,45 ± 4,0**	12,50 ± 4,3**	12,21 ± 2,7
болюсы, шт.	2,91 ± 0,3	3,16 ± 1,1	1,94 ± 0,4
заглядывания в норки	2,75 ± 1,3*	1,00 ± 0,2	3,11 ± 1,1

Примечание. ДА – число пересеченных горизонтальных квадратов; ВА – число вертикальных стоек; груминг – время гигиенических процедур, отряхиваний, облизываний и т.д., болюсы – число дефекаций, шт; Тцентр., с – время нахождения животных в центральной части открытого пространства в сек; реверсы – возвраты. *P ≤ 0,05 между возрастными группами по сравнению с данными 12 мес крыс, ** P ≤ 0,05 по сравнению с контролем.

Таблица 2

Показатели уровня тревожности в тесте ПКЛ в разные сроки после трансплантации МНК

Показатель	Рукав	Группа крыс по возрасту		
		12 мес.	18 мес.	24 мес.
через 30 сут				
Количество посещений	0	0,88 ± 0,22	0,56 ± 0,09*	0,76 ± 0,03**
	3	1,56 ± 0,19	1,24 ± 0,11*	1,32 ± 0,09*
Время пребывания, сек	0	26,08 ± 3,45	21,00 ± 1,86*	19,86 ± 1,20*
	3	273,00 ± 8,20	277,68 ± 14,76**	279,18 ± 6,37**
Груминг, сек	0	1,52 ± 0,52	0	0
	3	13,96 ± 1,16	0,64 ± 0,11*	8,26 ± 1,31*
Кол-во верт.стоек в рукавах	0	0,20 ± 0,04	0,04 ± 0,01*	0
	3	1,24 ± 0,22	0,48 ± 0,02*	1,26 ± 0,30**
Кол-во свешиваний		1,24 ± 0,21	1,00 ± 0,13**	1,03 ± 0,29**
через 60 сут				
Количество посещений	0	0,41 ± 0,03	0,66 ± 0,12*	0,46 ± 0,06**
	3	1,05 ± 0,05	1,36 ± 0,16*	1,26 ± 0,15*
Время пребывания, сек	0	6,20 ± 0,75	9,86 ± 1,66*	8,06 ± 1,61*
	3	293,80 ± 3,75	290,34 ± 1,56**	291,93 ± 5,61**
Груминг, сек	0	0	0	0
	3	15,36 ± 1,66	6,73 ± 0,72*	19,26 ± 1,85*
Кол-во верт.стоек в рукавах	0	0,15 ± 0,01	0	0,03 ± 0,01*
	3	2,03 ± 0,25	1,33 ± 0,27*	1,83 ± 0,39*
Кол-во свешиваний		0,50 ± 0,11	0,46 ± 0,10*	0,79 ± 0,17*
через 90 сут				
Количество посещений	0	0,87 ± 0,11	0,60 ± 0,07*	0,73 ± 0,16**
	3	1,37 ± 0,14	2,04 ± 0,45*	1,23 ± 0,06**
Время пребывания, сек	0	36,92 ± 2,01	35,00 ± 2,38**	23,76 ± 1,27*
	3	258,45 ± 10,11	261,08 ± 13,49**	273,82 ± 15,10**
Груминг, сек	0	1,27 ± 0,29	0	0
	3	5,90 ± 1,01	4,44 ± 0,77*	10,32 ± 1,11*
Кол-во верт.стоек в рукавах	0	0,27 ± 0,02	0,60 ± 0,10*	0,06 ± 0,01*
	3	0,62 ± 0,15	0,76 ± 0,11**	1,49 ± 0,09*
Кол-во свешиваний		0,77 ± 0,17	1,20 ± 0,06*	0,63 ± 0,14**

Примечание. * – $p \leq 0,01$; ** – $p \leq 0,05$ по сравнению с данными 12-мес крыс, принятых за норму.

Таблица 3

Оценка когнитивной функции экспериментальных животных в разные сроки после введения МНК

Срок	Время поиска пост. места платформы, с			Время поиска при смене места платформы, с			Тест на сохранность образа, с		
	12 мес	18 мес	24 мес	12 мес	18 мес	24 мес	12 мес	18 мес	24 мес
30 сут	17,11 ± 4,17	19,62 ± 3,83*	21,62 ± 3,18*	14,10 ± 2,03	16,91 ± 2,39*	18,46 ± 3,97**	8,91 ± 0,97	12,79 ± 2,25**	11,46 ± 2,70*
60 сут	11,48 ± 3,60	16,40 ± 0,51*	16,06 ± 1,42*	3,20 ± 1,43	3,53 ± 0,57*	3,71 ± 0,72*	4,42 ± 1,75	5,97 ± 1,12*	7,20 ± 1,14*
90 сут	4,69 ± 1,62	4,80 ± 0,59*	4,19 ± 0,88*	3,39 ± 0,93	3,42 ± 0,88*	4,17 ± 0,64*	3,07 ± 1,12	5,56 ± 0,42**	4,08 ± 1,09**

Примечание. Достоверность по сравнению с 12 мес.: * – $p \leq 0,01$; ** – $p \leq 0,05$.

В табл. 3 представлены полученные данные в процентном соотношении по отношению к данным 12-мес крыс (молодых) взятых за норму.

Установлено улучшение ориентации в пространстве во всех группах животных на 90 сут после введения МНК – время достижения платформы уменьшилось

в 2–2,5 раза по сравнению с данными, полученными на 30 сут.

Анализ поведенческих показателей во всех тестах после введения МНК показал снижение двигательной активности животных, увеличение времени груминга, числа болюсов и реверсов. Все это отражает наличие умеренной тревожности во всех исследуемых группах как реакция организма на стресс – введение МНК. С течением времени эмоциональный фон стихает, поведение животных нормализуется. Грубых нарушений поведения не отмечено, животные адекватно реагируют на все внешние раздражители.

Исследование когнитивной функции животных после трансплантации МНК на 90 сут показало значительное улучшение функций интегративной деятельности стареющего мозга – старые крысы были активнее в нахождении постоянного места расположения платформы и еще сообразительнее в ситуации случайного положения платформы – обострились внимательность и образная память животных.

Выводы

1. На протяжении 60 сут после введения МНК в поведении животных наблюдается рост уровня тревожности. На 90 сут после введения МНК эмоциональный фон стихает, поведенческие реакции приходят в норму;

2. Отмечается значительное улучшение когнитивной функции у старых животных на 60–90 сут после введения МНК

Список литературы

1. Аскарлов М.Б. Трансплантация аутологичных клеток костного мозга для лечения длительно незаживающих язв желудка: дисс.... д-ра мед. наук. – М., 2009. – 200 с.
2. Бурешова О., Хьюстон Дж. П: Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Высшая школа, 1991. – 399 с.
3. Белошицкий В.В. Современные принципы моделирования черепно-мозговой травмы в эксперименте // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. – 2005. – № 12. – С. 83–84.
4. Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е. Клеточная трансплантация перспективное направление регенерационной медицины // В кн. Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций: под ред. Шумакова В.И. и Онищенко Н.А. – М., 2009. – С. 49–76.
5. Пальцев М. Медицина в свете клеточной биологии // Медицинская газета. – 2004. – № 26. – С. 4.
6. Шевченко О.П., Орлова О.В., Гуреев С.В. Результаты 6-месячного наблюдения пациентов после трансплантации аутологичных клеток костного мозга: связь динамики маркеров воспаления и апоптоза с эффективностью лечения // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2005. – № 3. – С. 52–53.
7. Шумаков В.И., Онищенко И.А., Крашенинников М.Е., и др. Костный мозг как источник получения мезенхимных клеток для восстановительной терапии поврежденных органов // Вестник трансплантологии искусственных органов. – 2002. – №4. – С. 46–53.
8. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow // Scand. J. Clin. Lab. Investig. – 1968. – Vol. 21 – Suppl. 97. – P. 1–9.
9. Ghannam S., Bouffi C., Djouad F., Jorgensen C, Noel D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanism and clinical application // Stem Cell Res. Ther. – 2010. – Vol. 15, № 1. – P. 2.
10. Strauer B.E., Yousef M., Schannwell C.M. The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study// European Journal of Heart Failure. – 2010. – V.12. – P. 721–729.