

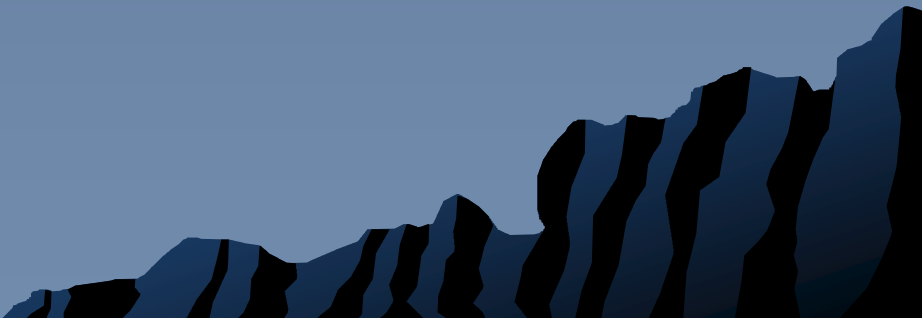
# The prospects of cell therapy in the treatment of opioid dependence

Evgeniya V. Markova  
MD, PhD. , Doctor of Medical Sciences

Head of Neuroimmunology Laboratory  
State Research Institute of Fundamental and Clinical  
Immunology

A dark blue silhouette of a mountain range is positioned in the bottom right corner of the slide, extending from the right edge towards the center.

The new integrative science, psychoneuroimmunology, which appeared in the last third of the XX century, every year attracts more and more attention from researchers. This is due to the fact that the understanding of the functional unity of the nervous and immune systems, the interaction between them, opens up spectacular vistas in various fields of experimental and clinical medicine, and allows reconsider medical tactic when dealing with many diseases.

A dark blue silhouette of a jagged mountain range is positioned in the bottom right corner of the slide, partially overlapping the text area.

## **The immune system of higher nervous activity**

To date, there is no doubt that the nervous and immune systems interact closely in the process of their functioning. The interaction of these adaptive systems assumes a regulating effect on the part of the immune system to the central nervous system, and particularly, on higher nervous activity:

1. **Products of immune cells have psycho- and neurotrophic effects, participates in physiological mechanisms of memory, the regulation of sleep and wakefulness, HPA axis activity, the implementation of stress reaction** (Raber J. 1998, Cohen F. 1999, Yalley S. 1999, Korneva E.A. 2000, Wong M. 2000, Turin N. 2001, Anisman M. 2002, 2003, Dantzer R. 2004 -2009, Elenkov J. 2006, Wrona D. 2006, Мюльберг А.А. 2006, Ader R. 2007, Zalcman S.S., 2009 and other.)
2. **Formation of the immune response to different antigens and effects of non-specific immune system activators are accompanied by modulation of higher nervous activity** (Buttini M., Boddeke H. 1995, Хаитов Р.М. 1997, Dantzer R.. 1998 - 2012, Blutte R.. 1998, Vidal J., 1999, Hanisch U.K., 2001, Uchakin P.N., 2008, Myint A.M, 209, Ader R. 2009, and other.).
3. **Activation of the immune system is accompanied by a change in cognitive and behavioral reactions** (Kent S 1992, McCarthy P. 1995, Gibertini M. 1998, Aubert A. 1999, Pugh C. 2000, Sell K. 2001, Larson S. 2001, 2002,, Dantzer R. 2004 -1012 , Zalcman S.S., 2009, Nguyen K. 2012 and other)
4. **Immunological mechanisms involved in the formation of emotional reactions in animals and humans** (Irvin M. 1999, Licino J. 1999, Rohen F. 1999, Leonard B. 2001, Pollak J. 2002, Arushanyan E.B. 2004, Prossin A. 2011 and other)

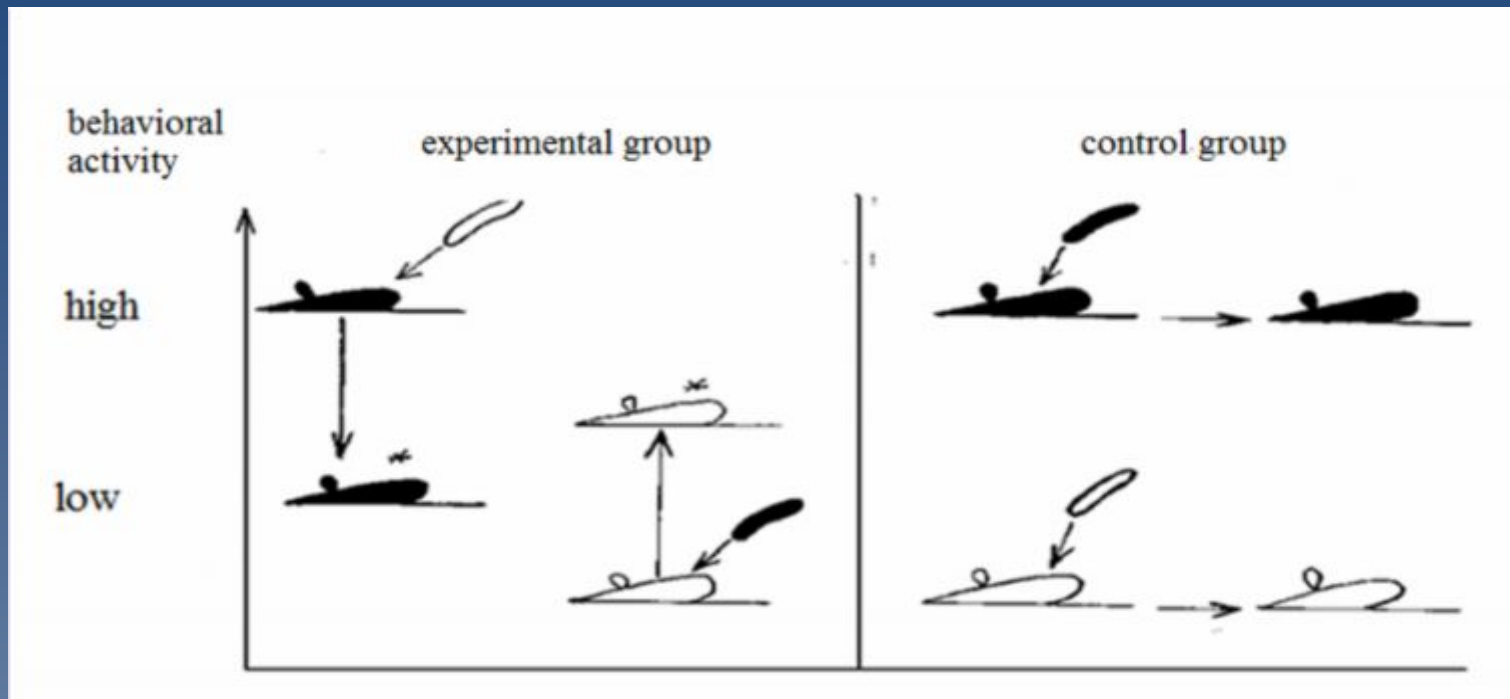
**We studied an afferent link between immune system and brain: mechanisms of the brain response to the immune system activation, the participation of immunogenic factors and cellular components of the immune system in the regulation of the brain's physiological functions. We established peculiarities of the immune system functioning in experimental animals with different levels of oriented - exploratory behavior and identified certain patterns of change the functional activity of the nervous system due to the activation of the immune system and immune cells transplantation. It was shown that the immune cells of mice with active and passive types of the behavior in "open field" differ in their functional characteristics.**

**We first demonstrated the possibility of immune cells with definite functional characteristics directionally change parameters of the oriented - exploratory behavior in singeing mice-recipients after transplantation.**

**Main publications:**

1. Markova E.V., Gromykhina N.Yu., Kozlov V.A., Abramov V.V. The peculiarities of the immune status in mice with different level of behavioral reaction.// Russian J. of Immunology, 2000.- V.5.- N.1.- P.89-95.
2. Abramov V.V., Markova E.V., Gontova I.A., Yakushenko E.V., Korotkova N.A., Abramova T.Ya., Kozlov V.A. The interdependence of behavior and immunity: possible mechanisms and significance.// Russian J. of Immunology, 2001. – V.6. – N.2. - P. 215-220.
3. EV Markova, TG Chernova, PN Filimonov, VV Abramov, VA: Kozlov, "Immunomorphological characteristics of animals with different levels of orientation and exploratory behavior", Bull Exp Biol Med; vol.138, no.4, pp.415-417, 2004.
4. Markova E.V., Kozlov V.A., Trofimova N.A., Kolosova N.G. Stimulation of cell component of the immune response activates exploratory behavior in senescence accelerated OXYS rats // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2005. T. 140. № 3. C. 345-347.
5. E.V. Markova, V.V. Abramov, N.A. Korotkova, V. A. Kozlov, "Effect of transplantation of immunocompetent cell on oriental and exploratory behavior and cytokine gene expression in the brain of experimental animals", Bull Exp Biol. Med, vol.142, no.3, pp. 338-340, 2006.
6. E.V. Markova, V.V. Abramov, V.A. Kozlov, " Regulation of the Behavior Reactions by the Immune Cell Transplantation", Proceedings of the 2nd European Congress of Immunology. Free Papers. Editors Reinhold E. Schmidt. MEDIMOND S.r.l., Bolonga, Italy, pp. 551-555, 2009.
7. EV Markova, VV Abramov, TG Ryabicheva, VA Kozlov, " Effect of transplantation of splenic lymphoid cells on functional activity of the immune and nervous system in experimental animals", Bull Exp Biol Med, vol.147, no.4, pp. 453-457, 2009.
8. Markova E.V., Knyazeva M.A., Kozlov V.A. Immune parameters in mice with aggressive- and depressive-like behavior / Int. Journal of Advanced Studies., 2012. – P. 21-27..
9. E.V. Markova, "The immune system and the higher nervous activity: mechanisms of neuroimmune interactions in the realization and regulation of behavioral responses", LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG, Germany, 2012.- 259 p.,
10. Markova E.V., Knyazeva M.A., Kozlov V.A. Regulation of the behavior parameters in mice by the transplantation of immune cells with definite functional characteristics / Int. Journal of Advanced Studies., 2013. - P.9 – 13.
11. E. Markova and V. Kozlov. The Role of IL-1 in the Cytokine Network of the Body: from Gene Expression to Biological Effects / In the book: Advances in Genetics Research. Volume 10. Editors: Kevin V. Urbano. Nova Science Publishers, Inc, USA, 2013.- P.1-29.

## Regulation of the behavioral activity in mice by the immune cells transplantation



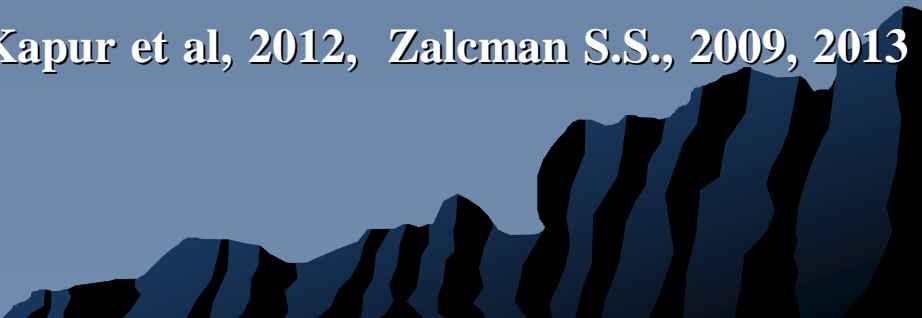
1. Intravenous transplantation of splenocytes from donors (CBAxC57Bl/6)F1 mice, characterized by low level of oriented – exploratory behavior in the “open field” test (passive type of behavior) to syngeneic recipients with high level of the behavior (active type of behavior) leads to a significant reduction in motor and exploratory activities in mice - recipients.
2. Transplantation of splenocytes from donors with active type of oriented - exploratory behavior to syngeneic recipients with passive type of the behavior leads to stimulation of motor and exploratory activities in mice - recipients.
3. Transplantation of immune cells is not accompanied by any changes in the behavioral parameters if the donor and recipient were similar in behavioral status.

Хроническая опиатная зависимость является ярким примером патологии, характеризующейся нарушением нейроиммунного взаимодействия.

Опиатные  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  рецепторы представлены на клетках как нервной, так и иммунной систем (Zastrow, M., 2003, Saurer T.B. et al 2003 , Sharp, B 2004, Avila, A., 2004, Sharp B.M. 2006, Weber R.J. et al 2006); они опосредуют влияние опиоидов на функциональную активность основных гомеостатических систем организма , модулируя их взаимное регуляторное влияние.

Морфин, как известно, взаимодействует с  $\mu$  – рецепторами головного мозга и обладает выраженным влиянием на поведенческие реакции.

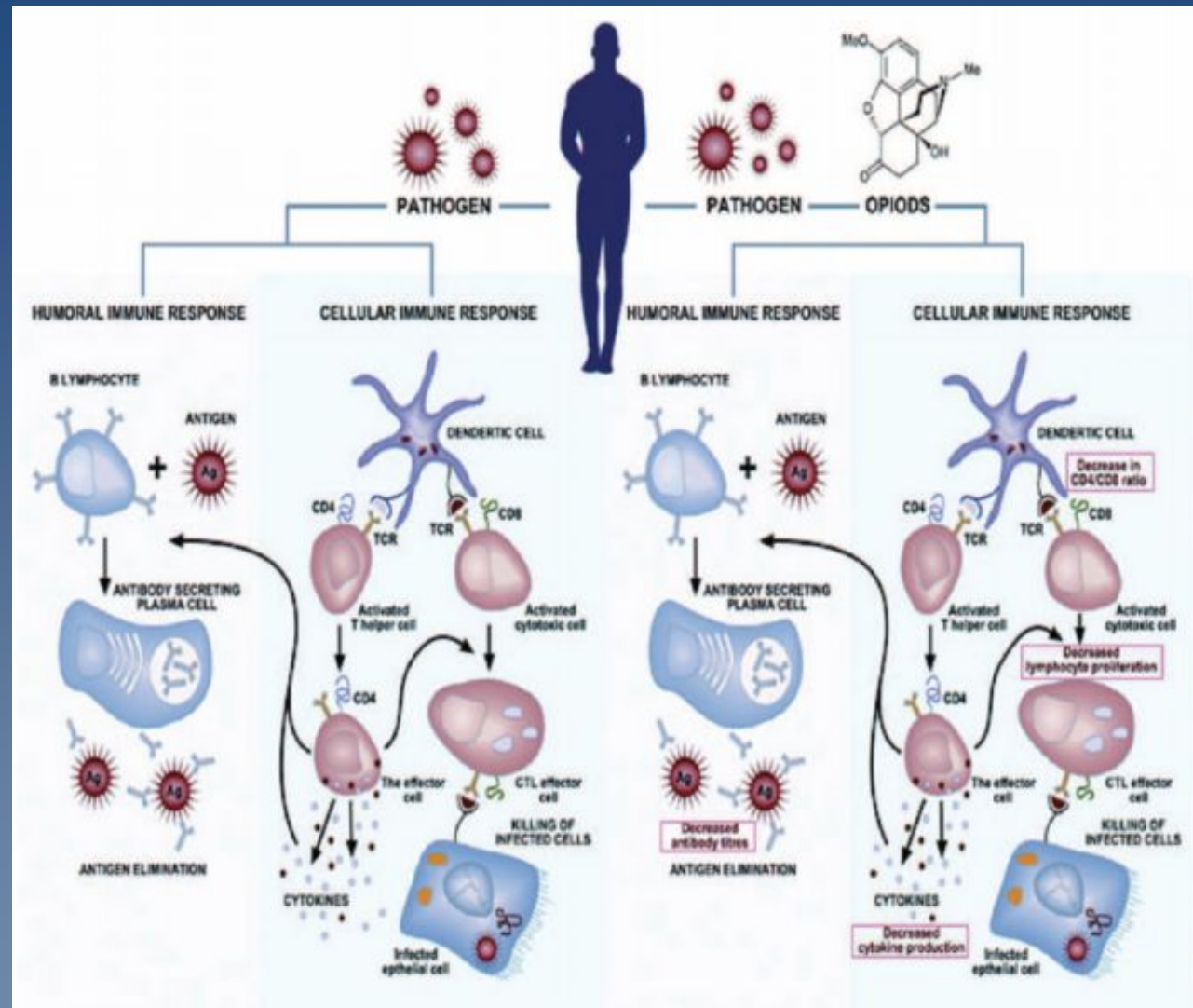
Вместе с тем, известны и его супрессивные эффекты (как прямые, так и опосредованные через центральные механизмы) на функции иммунной системы [Saurer T.B. et al 2003 , Weber R.J. et al 2006, Ader R. 2007, Lori Whitten 2008, Woody, G.E , 2008; Vassou et al, 2008, S. Kapur et al, 2012, Zalcman S.S., 2009, 2013 and other).





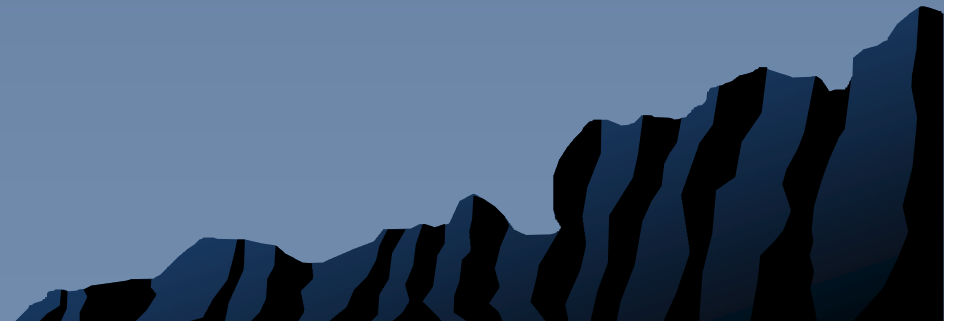
# Влияние опиатов на иммунную систему

- Снижение пролиферативного ответа Т-лимфоцитов на специфические антигены
- Снижение пролиферативной активности В - лимфоцитов, подавление продукции антител
- Снижение активности NK- клеток и цитотоксичности
- Снижение активности клеток моноцитарно-макрофагального ряда
- Активация апоптоза иммунокомпетентных клеток
- Стимуляция ГН системы с последующей супрессией иммунного ответа
- Иммуносупрессия посредством модуляции активности автономной нервной системы.



При этом макрофагам предположительно отводится лидирующая роль в опосредовании иммуносупрессивных эффектов морфина. Администрация морфина модулирует различные функции макрофагов, в том числе хемотаксис, фагоцитоз, синтез и продукцию про- и противовоспалительных цитокинов- IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-12 (Beagles K, 2004 ; Wang, 2005, Cataldo Martucci, 2007 Joey, Categories, 2010; и др).

Based on the results of our previous research the **objective** of the present study was to investigate behavioral and immunological disorders arising during the formation of chronic opiate dependence in experimental animals with different behavioral status; and to analyze the possibility of their correction by the transplantation of immune cells with defined functional characteristics.





## Study design:

Experiments were held on 3-month-old male (CBAxC57BL/6) F1 mice (n=84) with low and high activity in the «open field» test.

Mice with active and passive behavioral types were placed to individual cages and allowed access to morphine solution with 2% sucrose as a source of fluid for 25 days according to the scheme: 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml each for 48 h and 0.4 mg/ml during the following days. Quantity of consumed morphine solution was measured daily. Control group of animals received sucrose solution.

### *Isolation of splenocytes from mice-donors and cells transplantation*

Splenocytes were received aseptically from healthy mice-donors.

Macrophage-enriched spleen cells was isolated by adhesion on plastic for 2 hours at 37°C. Adherent cells were removed from plastic with Cell Scraper (Becton Dickinson); 86-92% of obtained population consisted of macrophages. Cells viability was estimated by inclusion of trypan blue and made up 93-95 %.

Unfractionated spleen cells ( $15-20 \times 10^6$ ) or macrophage-enriched adherent spleen cells ( $8-10 \times 10^6$ ) from healthy donors were injected intravenously (in 0.2 ml RPMI-1640) to morphine-dependent mice recipients with the same initial behavior status.

Exploratory behavior and immune parameters were tested before and on the 5-th day after the transplantation.

Proliferative activity of splenocytes was estimated by blast transformation, using suboptimal concentrations of LPS *E. coli* 0III:B4 (Sigma) - 25 µg/ml and Con A (Pharmacia) - 1 µg/ml.

Antibody-forming cells were counted on the 5-th day after intraperitoneal injection of sheep red blood cells (5%-0,5 ml / mouse) using modified J. Cunningham method.

IL-1β mRNA in brain and spleen of mice-recipients was measured by RT-PCR assays ; quantitative content of the cytokine was measured by ELISA.

**Statistical analysis :** All data were analyzed by the t-Student test and Mann-Whitney U test (Software “Statistica 6.0”) and presented as a Mean ± SD. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

**Потребление морфина мышами (СВА x C57Bl/6)F1  
с активным и пассивным типами поведения  
в «открытом поле»**

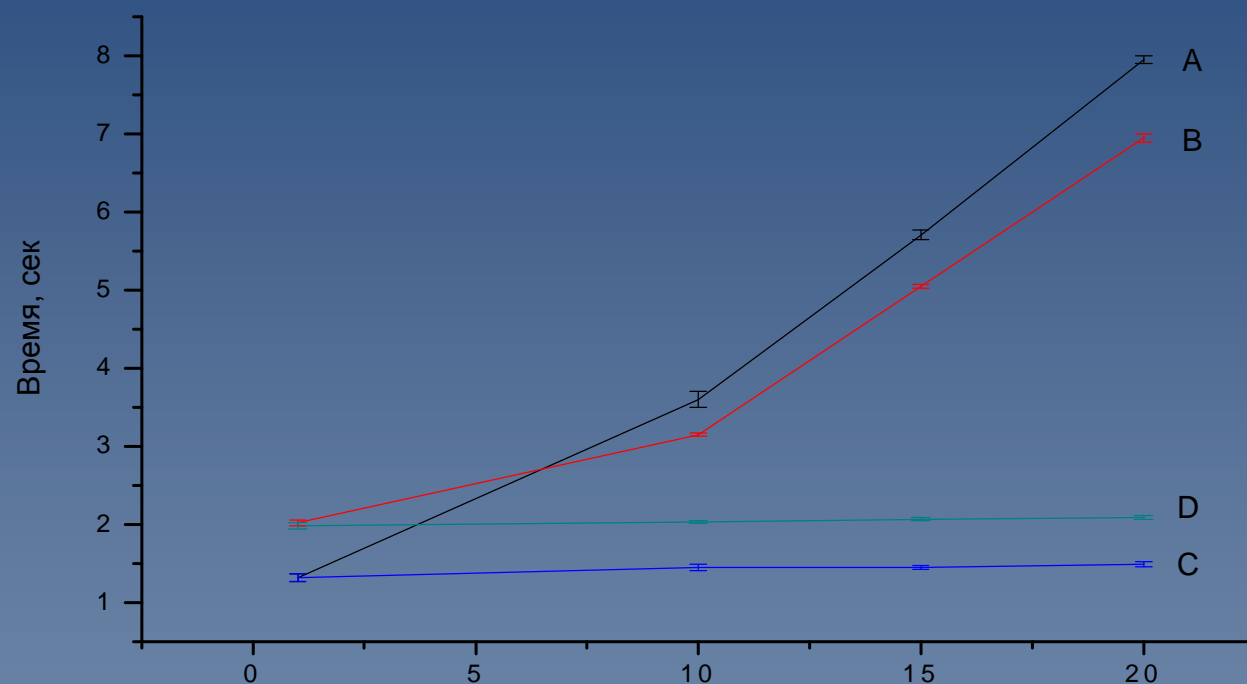
Группы животных	потребление морфина (мг)	
	среднесуточное	общее за курс
<i>Мыши с активным типом поведения</i>	1,01 ± 0,2	22,85 ± 5,3
<i>Мыши с пассивным типом поведения</i>	1,2 ± 0,3	26,16 ± 6,7

Примечание: у контрольных групп животных, получавших воду или 2 % раствор сахарозы, на всем периоде спаивания не было отмечено изменений в количестве потребляемой жидкости,

# Поведенческие показатели синдрома отмены в ответ на введение налоксона у мышей (CBA x C57Bl/6)F1 с активным и пассивным типами поведения

Группы животных	Проявления синдрома отмены (налоксонный тест, 2мг/кг веса, в/б)					
<b>Мыши с пассивным типом поведения</b>	стереотипное качание головы, дрожание лап, «встряхивание мокрой собаки»	стереотипное качание головы, дрожание лап, «встряхивание мокрой собаки», птоз, жевательные движения, слабо выраженные	те же симптомы, но сильно выраженные корчи, диарея			
<b>Мыши с активным типом поведения</b>	реакция отсутствует	реакция отсутствует	реакция отсутствует	стереотипное качание головы, дрожание лап, «встряхивание мокрой собаки»	стереотипное качание головы, дрожание лап, «встряхивание мокрой собаки», птоз, жевательные движения, слабо выраженные	те же симптомы, но сильно выраженные корчи, диарея
	15	17	20	22	24	25
Продолжительность потребления морфина (дни)						

# Определение болевой чувствительности у мышей (CBAxС57Вl/6)F1 с пассивным и активным типами поведения в тесте «горячая пластина» (hot-plate test)



Примечание:

А (----) – мыши –морфинисты с исходно пассивным типом поведения;

В (---) - мыши –морфинисты с исходно активным типом поведения;

С (---) , D (---) – контрольные (не получавшие морфин ) группы мышей с пассивным и активным типами поведения соответственно.

**Анальгетический эффект морфина достоверно сильнее выражен у мышей с пассивным типом поведения.**

**Параметры ориентировочно – исследовательского поведения мышей  
(CBA x C57Bl/6)F1 с различным исходным поведенческим статусом при синдроме  
хронической зависимости от морфина и после трансплантации  
иммунокомпетентных клеток от здоровых доноров (M ± SD)**

Группы животных	Суммарная горизонтальная двигательная активность		Суммарная вертикальная двигательная активность		Дефекация	
	Животные с активным типом поведения	Животные с пассивным типом поведения	Животные с активным типом поведения	Животные с пассивным типом поведения	Животные с активным типом поведения	Животные с пассивным типом поведения
Контроль	270,9 ± 41,1	24,3 ± 7,2	21,1 ± 3,2	2,7 ± 2,1	1,1 ± 1,1	4,8 ± 0,9
Хроническая зависимость от морфина	245,6 ± 28,1	138,3 ± 37,4*	23,3 ± 4,6	8,8 ± 3,8*	1,3 ± 1,9	2,2 ± 1,9*
Трансплантация 1	259,8 ± 47,3	41,2 ± 9,1	24,3 ± 1,2	2,9 ± 1,2	1,2 ± 0,3	4,3 ± 1,3
Трансплантация 2	247,2 ± 31,3	31,2 ± 8,5	24,3 ± 1,2	1,9 ± 1,2	0,9 ± 0,5	5,3 ± 1,7

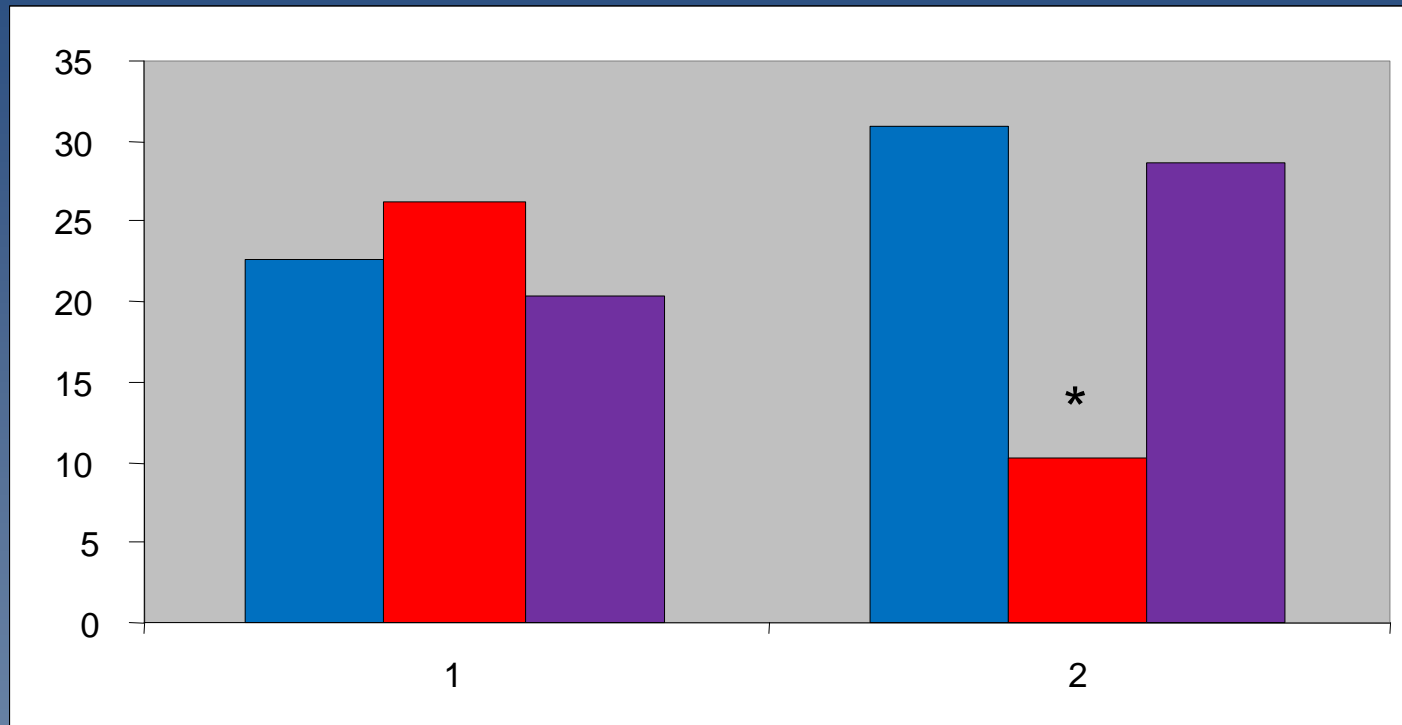
**Примечание:**

*трансплантация 1* – трансплантация неразделенной суспензии спленоцитов;

*трансплантация 2* - трансплантация моноцитарно-макрофагальной фракции спленоцитов;

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой животных.

**Уровень мРНК ИЛ-1 $\beta$  в клетках в клетках головного мозга мышей  
(СВА x C57Bl/6)F1 с синдромом хронической зависимости от морфина и после  
трансплантации спленоцитов моноцитарно-макрофагального ряда от  
здоровых доноров**



Примечание:

по оси абсцисс — животные с активным типом поведения (1)

животные с пассивным типом поведения (2).

по оси ординат — относительные единицы оптической плотности (единицы оптической плотности кДНК цитокина / единицы оптической плотности кДНК  $\beta$ -актина  $\times 100$ ).

■ - контрольная группа животных;

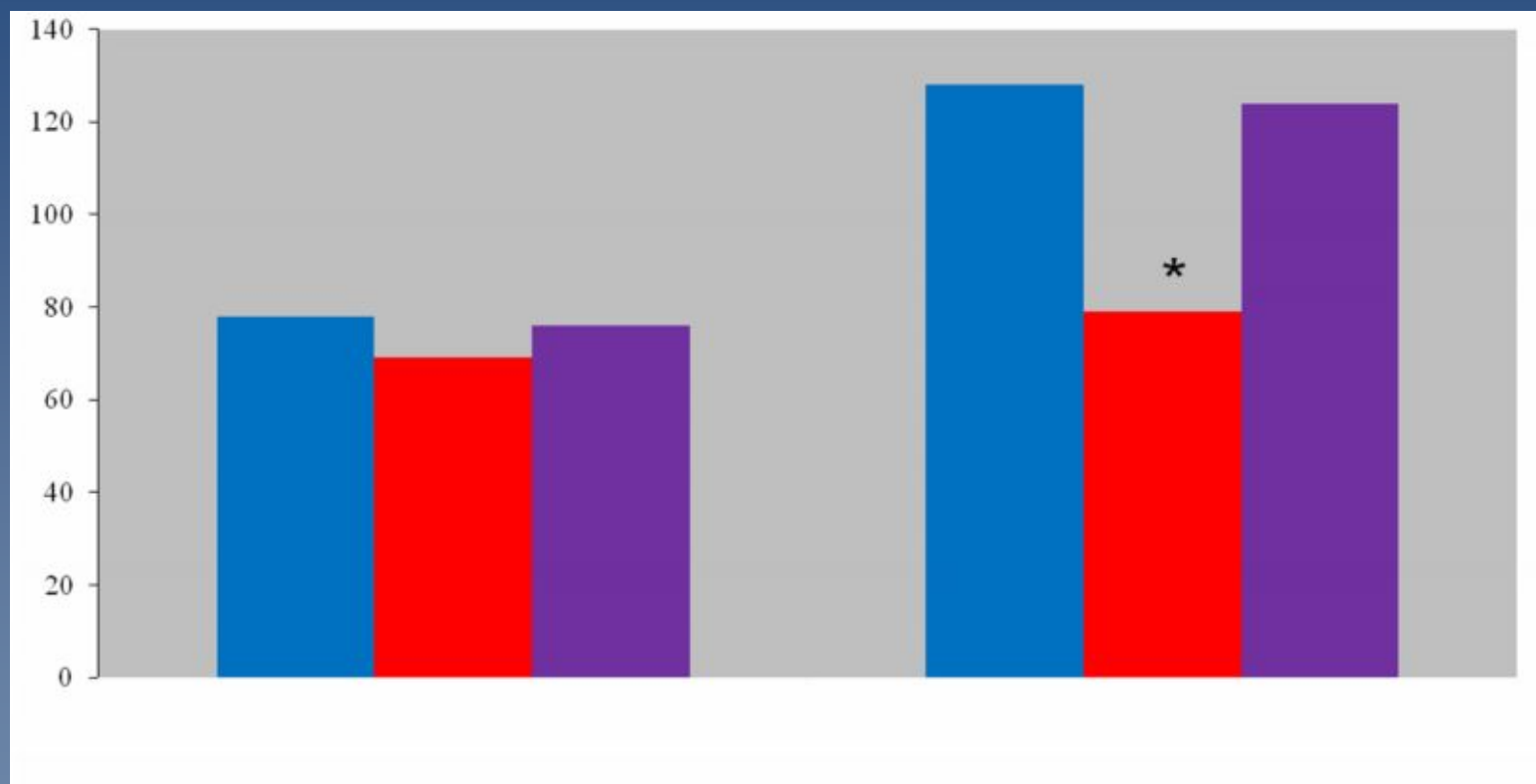
■ — животные с синдромом хронической зависимости от морфина;

■ — животные после трансплантации иммунокомпетентных клеток.

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой животных



## Содержание ИЛ-1 $\beta$ (пг/мл) в лизатах головного мозга мышей (СВА х С57В1/6)F1 с синдромом хронической зависимости от морфина и после трансплантации спленоцитов моноцитарно-макрофагального ряда от здоровых доноров



- - контрольная группа животных;
- - животные с синдромом хронической зависимости от морфина;
- - животные после трансплантации иммунокомпетентных клеток.

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой животных

**Пролиферативная активность спленоцитов  
мышей (СВА х С57В1/6)F1 с активным и пассивным типами  
поведения в состоянии хронической зависимости от морфина**

Группы животных		Пролиферативная активность спленоцитов ( имп/мин )		
		спонтанная	Кон А - индуцированная	ЛПС - индуцированная
<b>Животные с активным типом поведения</b>	<i>контроль</i>	1835,8 ± 172,4	34938 ± 2954,1	11551,3 ± 1403
	<i>хроническая зависимость от морфина</i>	1187,4 ± 96,2*	28261,7 ± 7271,4	1075,8 ± 172,4**
<b>Животные с пассивным типом поведения</b>	<i>контроль</i>	1215,7 ± 73,9	25880 ± 1160,0	3228,7 ± 396,3
	<i>хроническая зависимость от морфина</i>	431,0 ± 43,8**	10993,2 ± 1712,1*	9542,4 ± 413,8**

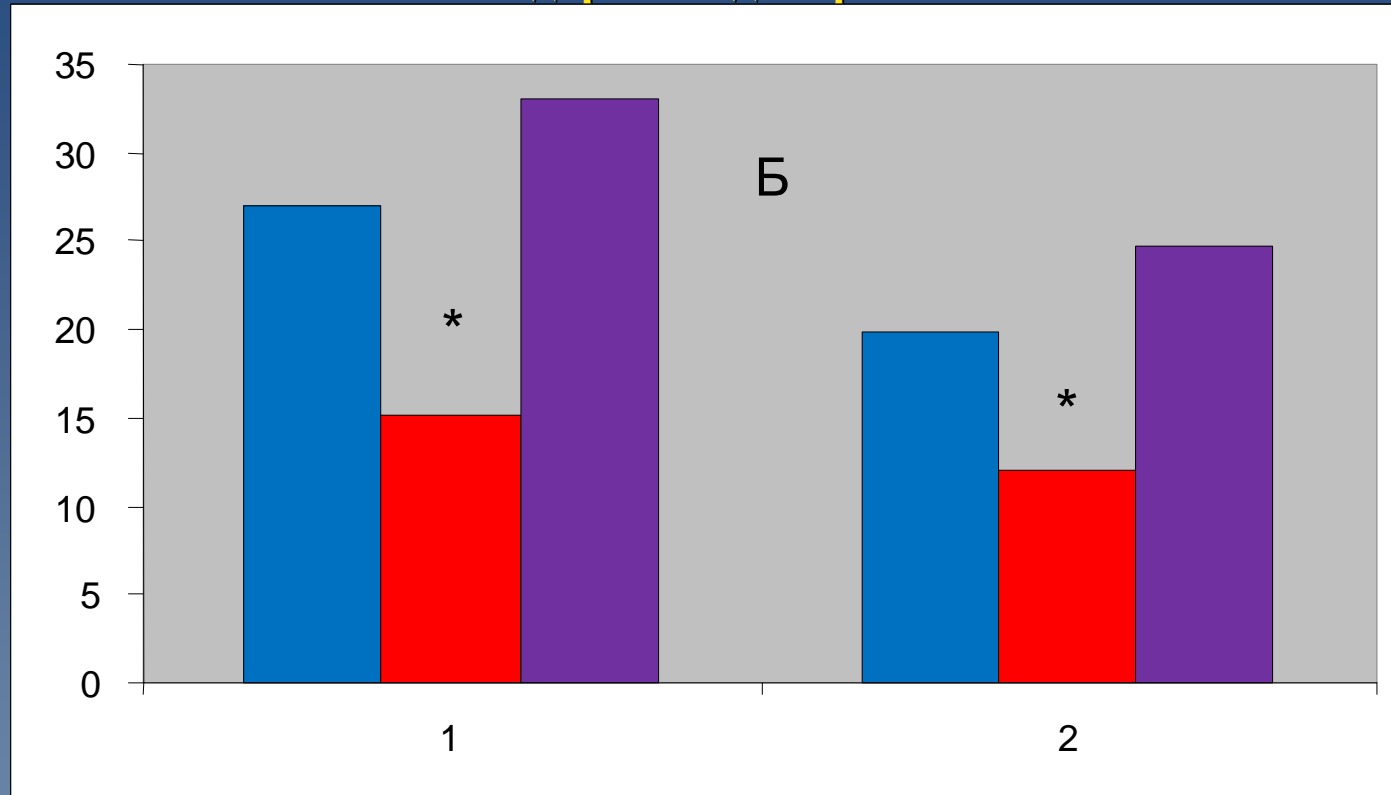
Примечание: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  по сравнению с контрольной группой животных.

**Гуморальный иммунный ответ у мышей (СВА х С57В1/6)F1  
с синдромом хронической зависимости от морфина и после  
трансплантации спленоцитов моноцитарно-макрофагального ряда  
от здоровых доноров ( $M \pm SD$ )**

Группы животных	Число АОК/10 <sup>6</sup> ядросодержащих клеток селезенки	Число клеток селезенки	Число АОК на селезенку
Контроль	1121,2 $\pm$ 172,8	135,7 $\pm$ 34,7	148533,5 $\pm$ 21109,0
Хроническая зависимость от морфина	<b>675,8 <math>\pm</math> 131,7*</b>	163,5 $\pm$ 31,5	<b>108724 <math>\pm</math> 21312*</b>
Трансплантация	1159,6 $\pm$ 238,2	123,0 $\pm$ 17,4	142165,8 $\pm$ 34073

Примечание: \* -  $p < 0,01$  по сравнению с контрольной группой животных;  $n = 25 - 30$  в каждой группе

# Уровень мРНК ИЛ-1 $\beta$ в клетках селезенки мышей (СВА x C57Bl/6)F1 с синдромом хронической зависимости от морфина и после трансплантации спленоцитов моноцитарно-макрофагального ряда от здоровых доноров



Примечание:

по оси абсцисс – животные с активным типом поведения (1)

животные с пассивным типом поведения (2).

по оси ординат – относительные единицы оптической плотности (единицы оптической плотности кДНК цитокина / единицы оптической плотности кДНК  $\beta$ -актина  $\times 100$ ).

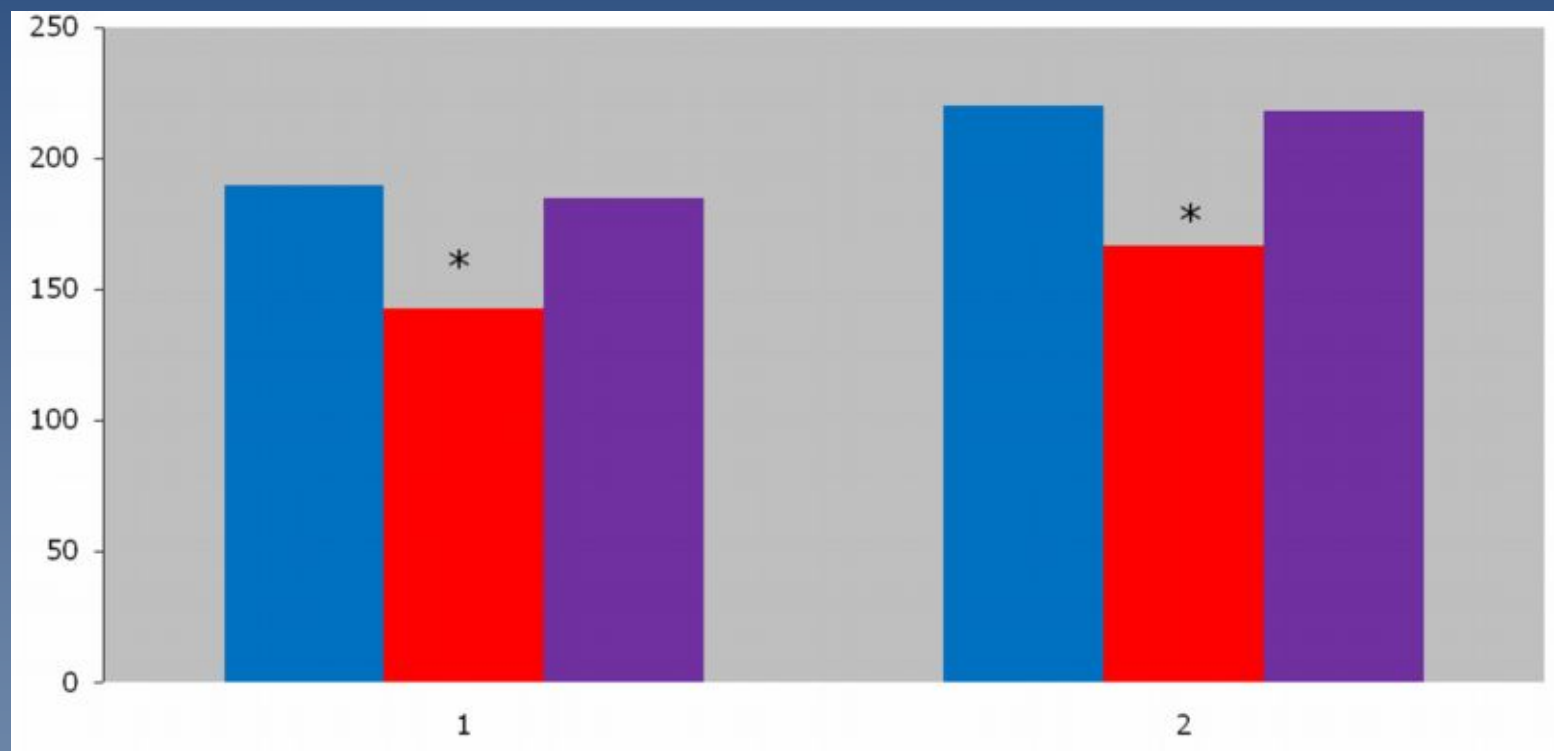
■ - контрольная группа животных;

■ – животные с синдромом хронической зависимости от морфина;

■ – животные после трансплантации иммунокомпетентных клеток.

\* -  $p \leq 0.05$  по сравнению с контрольной группой животных

## Содержание ИЛ-1 $\beta$ (пг/мл) в селезенке мышей (СВА х С57В1/6)F1 с синдромом хронической зависимости от морфина и после трансплантации спленоцитов моноцитарно-макрофагального ряда от здоровых доноров

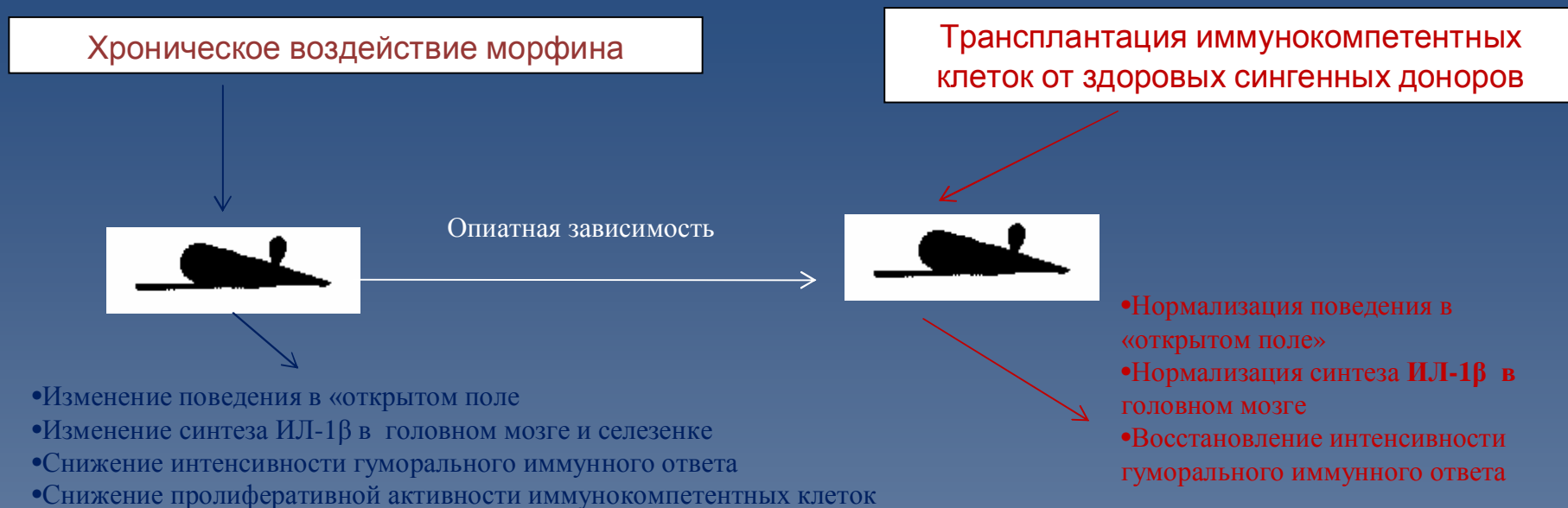


Примечание:

- - контрольная группа животных;
- - животные с синдромом хронической зависимости от морфина;
- - животные после трансплантации иммунокомпетентных клеток.

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой животных

## Влияние трансплантации иммунокомпетентных клеток на функциональную активность иммунной и нервной систем у сингенных животных-реципиентов в состоянии хронической зависимости от морфина



Представленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемая при хронической морфиновой зависимости супрессия гуморального иммунного ответа, снижение синтеза в спленоцитах и клетках головного мозга ИЛ-1 $\beta$ , равно как и поведенческие расстройства, могут быть устранены трансплантацией иммунокомпетентных клеток с определенной функциональной активностью, аналогичной таковой у здоровых доноров, соответствующих реципиентам по исходному поведенческому статусу.

В литературе имеются данные о терапевтическом эффекте при наркозависимости таких иммуноактивных препаратов, как тактивин, ИЛ-2 и др. Однако, они не нашли широкого применения по ряду причин. Возможно, это связано с избирательным, а не с комплексным эффектом препаратов на иммунную и нервную системы.



## Заключение:

Развитие опиатной зависимости не только влияет на функционирование нервной и иммунной систем, но и существенно изменяет их взаимную регуляцию.

Терапия аддиктивных расстройств, применяемая в настоящее время, не обеспечивает полного излечения, очевидно, в связи с формированием "порочного круга", разорвать который возможно лишь путем нормализации регуляторной взаимосвязи ЦНС и иммунной системы. Методом выбора при данной форме иммунодисрегуляторной патологии, очевидно, может стать иммунотерапия аутологичными иммунокомпетентными клетками, функциональная активность которых экстракорпорально изменена иммуномодуляторами, цитокинами.

Представленные результаты свидетельствуют о целесообразности апробации метода клеточной терапии в комплексном лечении наркозависимости. При этом, несомненно, возникнет вопрос о методах «терапии» самих иммунокомпетентных клеток в условиях *in vitro*, к чему побуждают данные о достаточно глубоких изменениях их функциональной активности при наркозависимости и для коррекции которых в лабораторных условиях сегодня имеются все возможности.

**Выражаем благодарность сотрудникам  
лаборатории центральных механизмов  
регуляции и управления  
ФГБНУ «НИИ молекулярной биологии и  
биофизики»  
за помощь в создании и характеристике модели  
хронической зависимости от морфина  
у мышей (CBA x C57Bl)F1.**

**Благодарю за внимание!**

A dark blue silhouette of a jagged mountain range or rocky terrain, positioned at the bottom right of the slide.