

ХАРАКТЕР ЭКСПРЕССИИ C-FOS НЕЙРОНАМИ МЕДИАЛЬНОЙ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ В УСЛОВИЯХ КОМБИНИРОВАННОГО СТРЕССА И ВЛИЯНИЯ ТЭС-ТЕРАПИИ

Каде А.Х.¹, Поляков П.П.¹, Липатова А.С.¹, Сотниченко А.С.¹, Куевда Е.В.¹,
Губарева Е.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, e-mail: palpal.p@yandex.ru

В настоящей работе изучалась стресс-индуцированная гиперактивация нейронов медиальной префронтальной коры крыс и возможность ее коррекции транскраниальной электростимуляцией (ТЭС-терапией). ТЭС-терапия оказывает системное благоприятное воздействие на нейроиммуноэндокринную регуляцию, связанное с усилением синтеза и секреции β-эндорфина и модуляцией работы серотонинергического, дофаминергического и холинергического механизмов. В качестве маркера активации клеток использовалась оценка экспрессии гена *c-fos* иммуногистохимическим методом. Индивидуальная стрессоустойчивость оценивалась при помощи модифицированного теста вынужденного плавания. В качестве модели комбинированного стресса использовались модифицированный тест вынужденного плавания и ортостатический стресс. Результаты настоящего исследования указывают на то, что транскраниальная электростимуляция уменьшает выраженность гиперактивации различных регионов медиальной префронтальной коры при стрессе, и соотносится с данными предшествующих работ.

Ключевые слова: ТЭС-терапия, тест вынужденного плавания, ортостатический стресс, *c-fos*, медиальная префронтальная кора.

STRESS-INDUCED C-FOS EXPRESSION IN MEDIAL PREFRONTAL CORTEX AND INFLUENCE OF TES-THERAPY

Kade A.Kh.¹, Polyakov P.P.¹, Lipatova A.S.¹, Sotnichenko A.S.¹, Kuevda E.V.¹,
Gubareva E.A.¹

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, e-mail: palpal.p@yandex.ru

In the present work, we studied stress-induced hyperactivation of the medial prefrontal cortex in rats and the possibility of its correction by transcranial electrotherapy stimulation (TES-therapy). TES-therapy has a systemic beneficial effect on neuroimmunoendocrine regulation associated with increased synthesis and secretion of β-endorphin and positively modulates serotonergic, dopaminergic and cholinergic neurotransmission. An immunohistochemical method was employed to detect the expression of *c-fos*, which was used as cell activation marker. Individual stress resistance was assessed by the modified forced swimming test. We used the modified forced swimming test and orthostatic stress as a model of combined stress. The results indicate that transcranial electrotherapy stimulation reduces the degree of hyperactivation of different regions of the medial prefrontal cortex under stress, and correlates with the data of previous studies.

Keywords: TES-therapy, forced swimming test, orthostatic stress, *c-fos*, medial prefrontal cortex.

Транскраниальная электростимуляция (ТЭС-терапия) оказывает системное стресс-лимитирующее воздействие на нейроиммуноэндокринную регуляцию, связанное с усилением синтеза и секреции β-эндорфина, а также модуляцией работы серотонинергического, дофаминергического и холинергического механизмов [1-4]. В единичных работах показана возможность ТЭС-терапии подавлять гиперактивацию нейронов стресс-респонсивных структур мозга (отражающуюся в усилении экспрессии гена *c-fos*) [1]. Однако существует необходимость расширить и дополнить представления об этом аспекте антистрессорного эффекта данного метода. А именно, изучить характер активации нейронов медиальной

префронтальной коры (мПФК), важнейшего координатора высокоорганизованной обработки информации о психогенных стрессорах, на модели комбинированного стресса (чрезвычайно часто имеющего место *in natura*) и влияние ТЭС-терапии на этот процесс.

Целью нашей работы является изучение возможности коррекции ТЭС-терапией выраженности индуцированной комбинированным стрессом экспрессии *c-fos* нейронами медиальной префронтальной коры крыс.

Материалы и методы исследования

Исследование было произведено на 50 взрослых белых нелинейных крысах-самцах массой 200-250 г. Содержание животных и постановка экспериментов проводились в соответствии с требованиями Приказа № 199н МЗ РФ от 01.04.2016 г. и Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных (1985).

Период адаптации перед экспериментом для всех крыс составлял 7 дней. Животные интактной группы не включались в эксперимент, забор материала производился в первый день после адаптации. Оценка выносливости, работоспособности и стрессоустойчивости остальных крыс производилась в первый день после адаптации при помощи модифицированного НЦБМТ РАМН (Научный центр биомедицинских технологий) теста вынужденного плавания (плавательного теста) [5]. Для этого стеклянный аквариум, квадратный в сечении (длина стороны 30 см), заполнялся водой (высота водного столба 40 см, температура воды 28 °С). К хвосту животного прикреплялся груз (10% от массы тела). Животное погружалось в аквариум и после утомления извлекалось из воды. Критериями утомления являлись отказ от плавания, невозможность всплытия на поверхность и адинамия более 10 секунд [3]. Оценка стрессоустойчивости осуществлялась по времени плавания до утомления. В эксперимент включались крысы, длительность плавания которых не отклонялась от среднего времени более чем на 35% [5]. После этого животные случайным образом разделялись на две группы: основную (ТЭС-терапия со 2-го по 6-й день, n=20) и группу сравнения (без ТЭС-терапии, n=20). За исключением ТЭС-терапии, все релевантные условия содержания, манипуляции и процедуры, производимые над животными основной группы и группы сравнения, были идентичны. ТЭС-терапия проводилась по методике, описанной нами ранее [2].

На 7-й и 8-й дни моделировался комбинированный стресс. Для этого использовались тест вынужденного плавания в модификации НЦБМТ РАМН, производимый на 7-й день, и ортостатический стресс на 8-й день. Ортостатический стресс (ОС) включал в себя фиксацию крыс в специальных футлярах из оргстекла (объем $0,75 \times 10^{-3} \text{ м}^3$) вниз головой под прямым углом к горизонтальной поверхности. ОС сочетался, таким образом, с иммобилизацией. Время

пребывания в антиортостатическом положении составляло 45 минут. Через 2 часа после ОС производился забор материала. Перед этим животное наркотизировали, используя золетил 0,8 мг на 100 г веса крысы в/м (Virbac, Франция), ксиланит 0,8 мг на 100 г веса крысы в/м (ЗАО «НИТА-ФАРМ», Россия, Саратов) [2]. Глубину наркоза верифицировали по угнетению роговичного рефлекса и исчезновению реакции на болевые раздражители.

Оценка экспрессии *c-fos* в префронтальной коре производилась иммуногистохимическим методом. После извлечения головной мозг фиксировался иммерсионным методом в 10%-ном нейтральном забуференном формалине. Дегидратация и заключение в парафин осуществлялись по стандартной методике при помощи гистопроцессора TP1020 (Leica, Germany) и модульной установки EG1150H (Leica, Germany). Срезы толщиной 5 мкм, изготовленные с помощью ротационного микротомы RM2235 (Leica, Germany), подвергались депарафинизации и регидратации. Эндогенная пероксидазная активность блокировалась добавлением 3%-ного раствора H_2O_2 . Температурное восстановление эпитопа осуществлялось экспозицией в растворе Access Rodent (Menarino diagnostics, Italy) при температуре 95 °C (40 минут). Неспецифическая иммунореактивность блокировалась добавлением раствора Rat Background Block (Menarino diagnostics, Italy). Срезы инкубировались при комнатной температуре в течение 1 часа с первичными поликлональными кроличьими анти-Fos антителами (1:100, ab209794, Abcam, UK). Для отрицательного контроля вместо первичных антител добавлялся фосфатный буферный раствор. Детекция белка интереса осуществлялась по системе ABC (avidin-biotin complex). После инкубации с биотинилированными козьими антителами (ab64261, Abcam, UK) в течение 10 минут при комнатной температуре, и четырехкратной отмывки фосфатным буферным раствором добавлялся стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (ab64261, Abcam, UK) на 10 минут при комнатной температуре. Затем срезы промывались 4 раза, и добавлением DAB хромогена на 5 минут выявлялся белок интереса. После этого производились четырехкратная отмывка фосфатным буферным раствором, контрастирующее окрашивание, дегидратация в спиртах восходящей концентрации и ксилоле и заключение срезов в монтирующую среду ConsulMount (Thermo Fisher Scientific, USA). Реакция считалась положительной при появлении коричневой окраски.

Идентификация уровней срезов и границ анатомических структур осуществлялась при помощи стереотаксических атласов мозга крысы [6]. Изучение срезов и получение фотографий проводилось с помощью микроскопа Olympus IX51 (Olympus, Japan). Изображения, имеющие одинаковые увеличение и разрешение, сохранялись в виде отдельных файлов в формате TIFF без сжатия. Посредством графического редактора GNU Image Manipulation Program (Free Software Foundation, USA) производилось выравнивание

экспозиции и нормализация по балансу белого. Подсчет иммунореактивных клеток производился в симметричных отделах коры обоих полушарий. В каждом полушарии изучались 6 фиксированных областей площадью $0,0625 \text{ мм}^2$ ($0,25 \times 0,25 \text{ мм}$), включавших в себя поверхностные (прилежащие срединным структурам) и глубокие слои (прилежащие *forceps minor corporis callosi*) передней цингулярной коры (AC), инфраламбической коры (IL) и прелимбической коры (PL). В качестве ориентира использовался уровень, удаленный в переднезаднем направлении от брегмы на 3 мм (рис. 1). Для морфометрического анализа изображения использовалась программа ImageJ 1.50i (National Institutes of Health, USA). После преобразования (Threshold) 8-битовых изображений в маски производился автоматический подсчет частиц (Analyze Particles). Учитывались частицы размером более 4 пикселей (соответствовавших $8,9 \text{ мкм}^2$ на реальном препарате). Автоматический анализ дополнялся ручным методом. Исследователь, производивший подсчет, не имел информации о принадлежности крысы к той или иной группе.

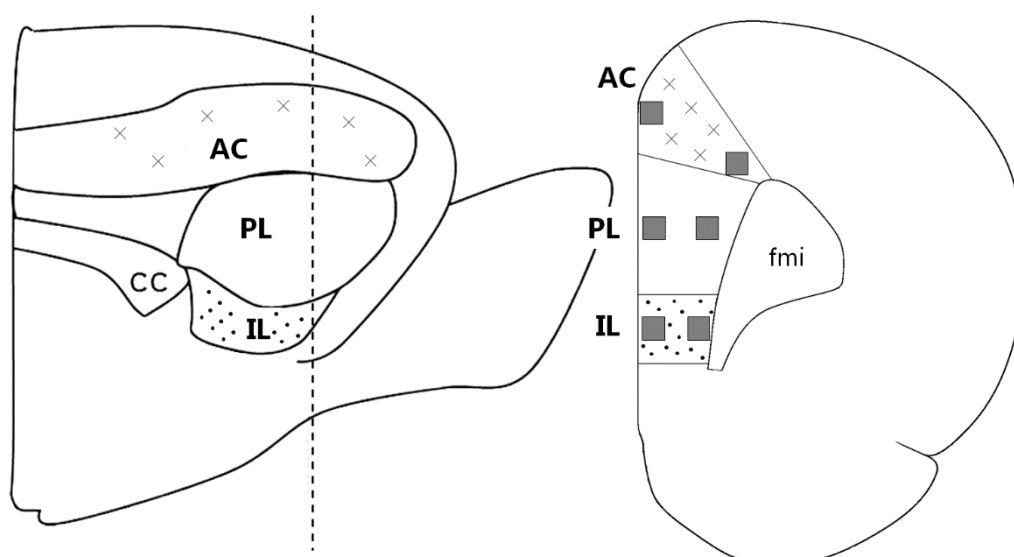


Рис. 1. Анализируемые области медиальной префронтальной коры (обозначены серыми прямоугольниками); CC - corpus callosum, fmi - forceps minor corporis callosi (из [6] и [7] с изменениями)

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета программ STATISTICA (StatSoft, USA). Гипотеза о виде распределения проверялась посредством критерия Шапиро-Уилка. Поскольку закон распределения полученных значений отличался от нормального, данные представлялись в виде медианы (Me), верхнего (75%) и нижнего (25%) квартилей (Q_1 - Q_3), а для выполнения задачи сравнения двух независимых групп использовался непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Критический уровень

значимости нулевой статистической гипотезы в соответствии с принятыми в медико-биологических исследованиях критериями принимался равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Как следует из таблицы, количество Fos-позитивных клеток во всех исследуемых регионах префронтальной коры животных группы сравнения превышало таковое в основной группе, что отражает способность ТЭС-терапии предупреждать и уменьшать стресс-индуцированную гиперактивацию исследуемых структур.

Количество иммунореактивных клеток в исследуемых областях префронтальной коры

Регион	Me (Q ₁ -Q ₃)	
	Основная группа (ТЭС-терапия)	Группа сравнения (нет ТЭС-терапии)
АС, поверхностный	20 (16-26)	37* (34-48)
АС, глубокий	17 (12-20)	32** (27-45)
PL, поверхностный	17 (13-18)	40*** (32-51)
PL, глубокий	18 (15,5-19,5)	34[#] (31-46)
IL, поверхностный	15 (11,5-23)	37^{##} (32-39)
IL, глубокий	15 (13-18)	38,5^{###} (36-43)

По сравнению с основной группой: * - p=0,002, ** - p=0,0008, *** - p=0,0005, [#] - p=0,001, ^{##} - p=0,004, ^{###} - p=0,0003.

На рисунке 2 представлены примеры изображений поверхностных и глубоких слоев АС, PL и IL.

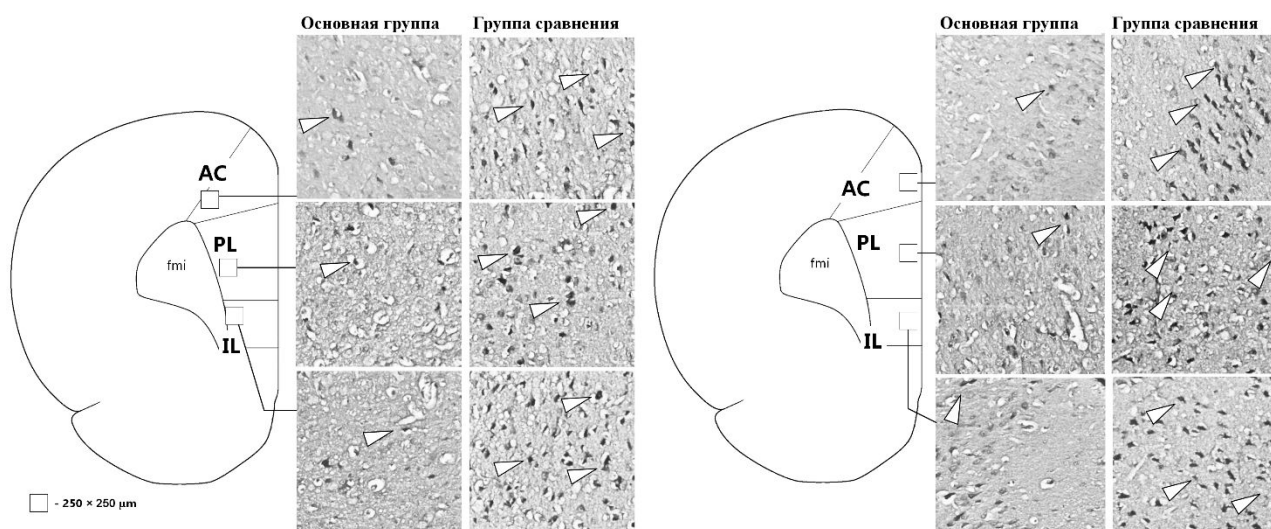


Рис. 2. Примеры изображений поверхностных (справа) и глубоких (слева) слоев AC, PL и IL. Белыми треугольниками обозначены примеры Fos-позитивных клеток, *fmi* - *forceps minor corporis callosi*

Медиальная префронтальная кора является важнейшим координатором стрессовых реакций [7]. Анатомически мПФК крысы подразделяется на три региона, отличных по citoархитектонике, связям с другими центрами и функциям: переднюю цингулярную (AC), прелимбическую (PL) и инфралимбическую (IL) кору, которые гомологичны полям Бродмана 24b, 32 и 25 соответственно. Большинство клеток мПФК (80–90%) – глутаматергические пирамидальные нейроны, которые связаны с важнейшими стресс-реализующими системами: автономной нервной системой (АНС) и гипоталамо-гипофизарно надпочечниковой осью (ГГН). Передняя цингулярная кора вовлечена в регуляцию процессов пространственной ориентировки, движения и восприятия боли. Прелимбическая кора имеет связи с гипоталамическими структурами, ядрами шва, полосатым телом, опорным ядром терминального тяжа и участвует в когнитивном процессинге информации о стрессовых стимулах, системе вознаграждений и пр. Прелимбическая кора, подобно гиппокампу, оказывает преимущественно ингибирующее действие на активацию ГГН оси и симпатической нервной системы при психоэмоциональном стрессе и действует в большей степени на длительность, чем на интенсивность продукции глюкокортикоидов. Билатеральное повреждение данного региона, равно как и передней цингулярной коры, сопряжено с гиперактивацией ПВЯ при иммобилизации, но не при ингаляции эфира (физический стресс). Инфралимбическая кора связана с вентролатеральными регионами продолговатого мозга, ядром одиночного пути, центральным амигдаллярным ядром и оказывает стимулирующее действие на стресс-реализующие системы.

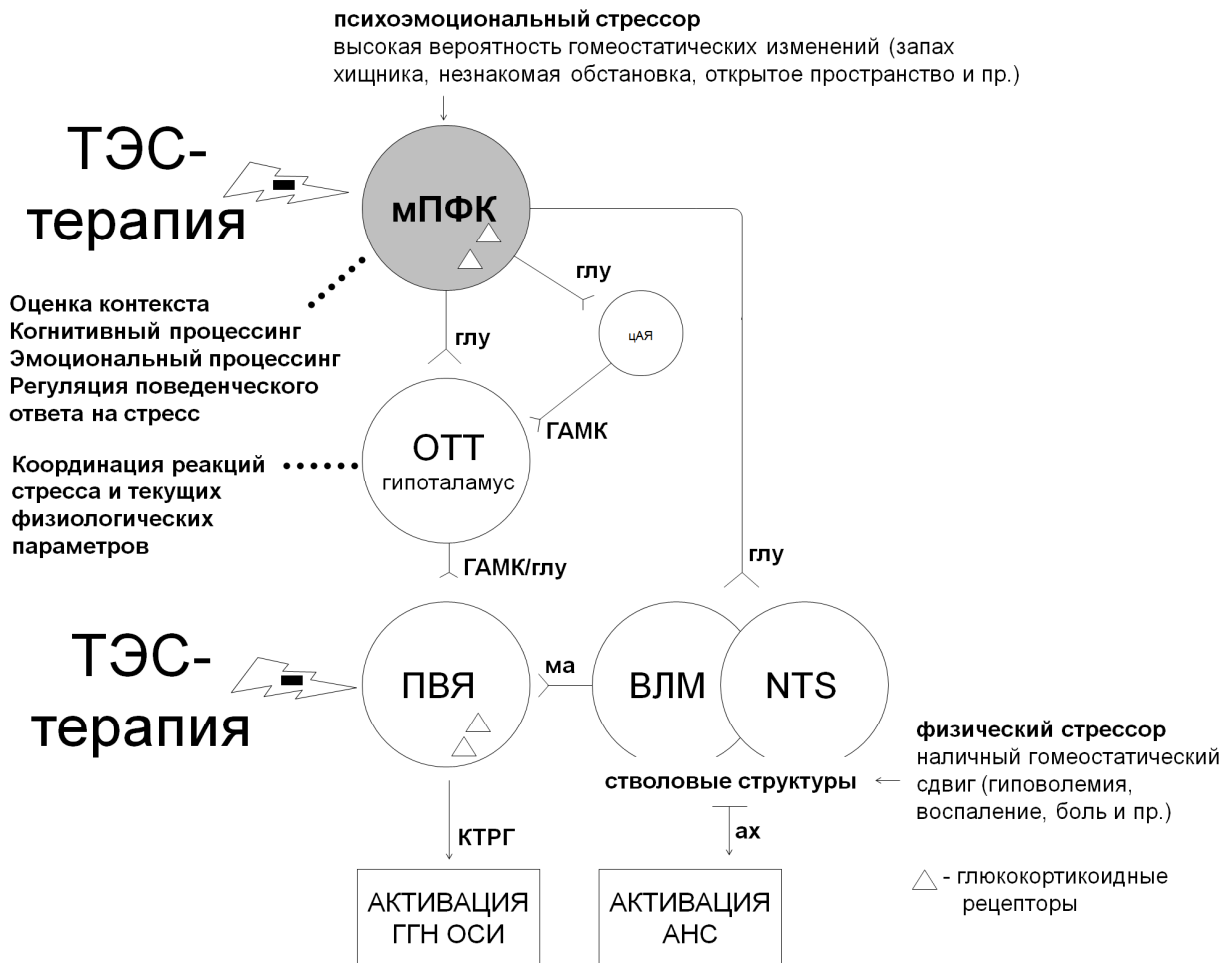


Рис. 3. Место медиальной префронтальной коры в реализации реакций стресса.

Ах – ацетилхолин, *ВЛМ* – вентролатеральные отделы продолговатого мозга, *ГАМК* - гаммааминомасляная кислота, *глу* – глутамат, *КТРГ* – кортикотропный рилизинг-гормон, *ма* – моноамины, *мПФК* – медиальная префронтальная кора, *ОТТ* – опорное ядро терминального тяжа, *ПВЯ* – паравентрикулярное ядро гипоталамуса, *цАЯ* – центральное амигдаллярное ядро, *NTS* – nucleus tracti solitarii

Медиальная префронтальная кора связана с ГГН осью не напрямую, а через ряд структур, например прелимбическая кора - через опорное ядро терминального тяжа, нейроны которого, в свою очередь, посылают ГАМК-ергические проекции кортиколиберин-продуцирующим клеткам паравентрикулярного ядра гипоталамуса. Структура, связывающая инфраламбическую кору и ГГН ось, не известна; существуют доказательства, что данную роль могут исполнять опорное ядро терминального тяжа, задний гипоталамус и ядро одиночного пути [7]. Клетки префронтальной коры имеют многочисленные глюкокортикоидные и минералокортикоидные рецепторы и принимают участие в ограничении реакций стресса по принципу отрицательной обратной связи. Имплантация ГК в префронтальную кору угнетает

активность ГГН оси (данный эффект также имеет место только при психоэмоциональном стрессе). Медиальная префронтальная кора (вместе с гиппокампом и миндалевидным телом) является важнейшим координирующим центром в иерархии обработки информации о психогенных стрессорах, принятия решений и регуляции поведенческого ответа на стресс и составляет часть так называемого социального мозга (рис. 3). Нарушения работы мПФК лежат в основе многих форм стресс-ассоциированных расстройств, включая большое депрессивное расстройство (БДД) и посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР). Известно, что нейроны 25 поля Бродмана метаболически гиперактивны при БДД, а глубокая стимуляция данного региона связана с уменьшением выраженности симптомов у пациентов с депрессией, стимуляция же гомологичных участков префронтальной коры крыс благоприятно сказывается на показателях в тесте вынужденного плавания.

Заключение

Результаты настоящего исследования указывают на то, что ТЭС-терапия предупреждает и уменьшает гиперактивацию передней цингулярной, прелимбической и инфраламбической коры при комбинированном стрессе. Это соотносится с данными предшествующих работ и закладывает теоретический фундамент клинического изучения эффективности ТЭС-терапии при БДД и ПТСР.

Список литературы

1. Влияние ТЭС-терапии на характер стресс-индуцированной экспрессии *c-fos* нейронами паравентрикулярного ядра гипоталамуса / Поляков П.П. [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2017. - № 5. – С. 121-126.
2. Модификация методики ТЭС-терапии для ее применения у мелких лабораторных грызунов / Липатова А.С. [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5.; - URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22696> (дата обращения: 11.07.2017).
3. Дыдышко Е.И. Динамика показателей иммуноантиоксидантного статуса у пациентов с гипотиреозом на фоне ТЭС-терапии / Е.И. Дыдышко, О.С. Охременко, В.Д. Левичкин // Кубанский научный медицинский вестник. – 2014. – № 4. – С. 50–54.
4. Влияние ТЭС-терапии на исходы острого адреналинового повреждения сердца у крыс / Трофименко А.И. [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2013. – № 5 (140). – С. 174–180.

5. Каркищенко В.Н. Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине // Биомедицина. – 2012. – №. 4. – С. 15-21.
6. Paxinos G. The rat Brain in Stereotaxic Coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – 6th edition. - Academic Press, 2007. – 456 p.
7. McKlveen J.M., Myers B., Herman J.P. The medial prefrontal cortex: coordinator of autonomic, neuroendocrine and behavioural responses to stress // Journal of neuroendocrinology. – 2015. - Vol. 27. - No. 6. - P.446-456.