

УДК 615.847:[612.112+577.218]:616-092.9

## ВЛИЯНИЕ ТЭС-ТЕРАПИИ НА ХАРАКТЕР СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА C-FOS МОНОНУКЛЕАРНЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ КРЫС РАЗЛИЧНОЙ СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ

Каде А.Х.<sup>1</sup>, Поляков П.П.<sup>1</sup>, Агумава А.А.<sup>2</sup>, Гусарук Л.Р.<sup>1</sup>, Цымбалов О.В.<sup>1</sup>,  
Алиметов А.Я.<sup>1</sup>, Липатова А.С.<sup>1</sup>, Вчерашнюк С.П.<sup>1</sup>, Кравченко С.В.<sup>1</sup>, Шаркова А.В.<sup>1</sup>,  
Черных Н.Ю.<sup>1</sup>, Белякова И.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, e-mail: palpal.p@\_yandex.ru;

<sup>2</sup>ФГБНУ «НИИ Медицинской приматологии», Сочи

Усиление экспрессии гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови является уникальным биомаркером стресса, стресс-ассоциированных и психиатрических заболеваний. В настоящей работе изучалась возможность коррекции индуцированных комбинированным стрессом нарушений экспрессии гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови у крыс с низкой и высокой стрессоустойчивостью, ранжированных в зависимости от временных показателей в модифицированном тесте принудительного плавания, транскраниальной электростимуляцией (ТЭС-терапией). В качестве модели комбинированного стресса использовались модифицированный тест принудительного плавания и ортостатический стресс. Оценка экспрессии гена *c-fos* мононуклеарными лейкоцитами периферической крови осуществлялась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Относительная экспрессия гена *c-fos* в подгруппе низкоустойчивых животных ( $Me=0,03$ ) группы сравнения (без ТЭС-терапии) была статистически значимо меньше таковой в подгруппе высокоустойчивых крыс ( $Me=1,3$ ). Применение ТЭС-терапии приводило к статистически значимому увеличению медианы относительной экспрессии гена *c-fos* ( $Me=1$ ) в подгруппе низкоустойчивых животных. В подгруппе высокоустойчивых животных применение ТЭС-терапии, напротив, сопровождалось снижением уровня относительной экспрессии гена *c-fos* ( $Me=0,15$ ). Эти эффекты являются проявлением системного стресс-лимитирующего действия ТЭС-терапии, имеющего выраженный гомеостатический характер.

Ключевые слова: ТЭС-терапия, *c-fos*, тест вынужденного плавания, ортостатический стресс, мононуклеарные лейкоциты, индивидуальная стрессоустойчивость.

## TRANSCRANIAL ELECTROTHERAPY STIMULATION MODULATES STRESS-INDUCED C-FOS EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO STRESS

Kade A.Kh.<sup>1</sup>, Polyakov P.P.<sup>1</sup>, Agumava A.A.<sup>2</sup>, Gusaruk L.R.<sup>1</sup>, Tsybalov O.V.<sup>1</sup>,  
Alimetov A.Y.<sup>1</sup>, Lipatova A.S.<sup>1</sup>, Vcherachnyuk S.P.<sup>1</sup>, Kravchenko S.V.<sup>1</sup>, Sharkova A.V.<sup>1</sup>,  
Chernykh N.Y.<sup>1</sup>, Belyakova I.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kuban State Medical University, Krasnodar, e-mail: palpal.p@yandex.ru;

<sup>2</sup>Scientific-Research Institute of Medical Primatology, Sochi

C-Fos expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) is a recognized and unique peripheral biomarker of stress, stress-associated and psychiatric disorders. In our article, we studied the possibility of correction of transcranial electrotherapy stimulation (TES-therapy) of stress-induced *c-fos* expression in PBMC of rats with high or low resistance to stress, predicted from differences in their modified forced swim test results. As a model of combined stress, a modified forced swim test and orthostatic stress were used. The expression of the *c-fos* gene in PBMC was carried out by real-time polymerase chain reaction. Relative *c-fos* expression in low resistance control group ( $Me=0,03$ ) was statistically significantly less than that in high resistance control group ( $Me=1,3$ ). TES-therapy was accompanied by a statistically significant increase in relative *c-fos* expression ( $Me=1$ ) in low resistance treatment group. In high resistance treatment group TES-therapy, on the contrary, was accompanied by a decrease in relative *c-fos* expression ( $Me=0,15$ ). These effects reflect the systemic stress limiting action of TES-therapy, which has a pronounced homeostatic character.

Keywords: TES-therapy, *c-fos*, forced swimming test, orthostatic stress, peripheral blood mononuclear cells, resistance to stress.

Транскраниальная электростимуляция (ТЭС-терапия) – лечебный метод, позволяющий при помощи неинвазивного воздействия током определенных характеристик селективно стимулировать синтез и секрецию  $\beta$ -эндорфина [1]. Активация опиоидэргической системы обладает нейропротекторным, противовоспалительным, антиоксидантным, нейротрофическим и антигипоксическим эффектами [2]. Благодаря этому ТЭС-терапия оказывает благоприятное стресс-лимитирующее влияние на нейроиммуноэндокринную регуляцию и используется для лечения широкого круга заболеваний. Одной из важнейших характеристик благоприятного эффекта ТЭС-терапии является гомеостатический характер действия метода [1-3]. Стресс-лимитирующий потенциал ТЭС-терапии был выявлен во многих экспериментальных и клинических работах, однако вопрос о влиянии ТЭС-терапии на стресс-индуцированную экспрессию гена *c-fos* мононуклеарными лейкоцитами крови остается недостаточно освещенным [1-5]. Последняя рассматривается в литературе в качестве маркера стресса и провоспалительного статуса и используется для оценки выраженности психических заболеваний [6-8].

Особого внимания заслуживает вопрос о влиянии индивидуальной стрессоустойчивости на характер стресс-индуцированной экспрессии *c-fos* мононуклеарными лейкоцитами. Ранжирование по стрессоустойчивости является ключевым методологическим приемом исследований, посвященных стрессу. Хорошо известны физиологические отличия низко- и высокоустойчивых животных, к числу которых, например, относится разное медиаторное обеспечение стресс-реактивных центров мозга [9]. Для исследований, посвященных ТЭС-терапии, эта разделение тем более важно, так как позволяет детализировать представления о гомеостатическом характере действия данного лечебного метода.

### **Цель работы**

Изучение влияния ТЭС-терапии на характер стресс-индуцированной экспрессии гена *c-fos* мононуклеарными лейкоцитами крыс различной стрессоустойчивости.

### **Материалы и методы исследования**

Объектом исследования были 50 взрослых белых нелинейных самцов крыс массой 200-250 г. Содержание животных, постановка, описание экспериментов и представление полученных результатов проводились в соответствии с требованиями Приказа № 199н МЗ РФ от 01.04.2016 г., рекомендациями ARRIVE (Animal Research: Reporting of *InVivo* Experiments, 2010) и MIQE (Minimum Information or Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, 2009) [10; 11].

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) [12]. 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 [12]. Оценка стрессоустойчивости осуществлялась по времени плавания до утомления. Животные, время плавания которых было меньше среднего или превышало среднее более чем на 35%, оценивались как низкоустойчивые и высокоустойчивые соответственно. Далее животные случайным образом разделялись на две группы: основную (ТЭС-терапия по 1 сеансу в день со 2-го по 6-й день, n=20) и группу сравнения (без ТЭС-терапии, n=20). Таким образом, были сформированы три группы: интактная, группа сравнения и основная. Две последние группы включали в себя подгруппы низко- и высокоустойчивых животных. ТЭС-терапия проводилась с помощью модифицированного двухпрограммного электростимулятора «ТРАНСАИР-03» (ООО «Центр транскраниальной электростимуляции», Санкт-Петербург). Продолжительность первого сеанса составляла 15 мин, всех последующих - по 30 мин. [13]. Параметры ТЭС-терапии для крыс представлены в таблице. В качестве подкожных электродов использовались булавки с антикоррозийным покрытием. Электроды располагались фронто-мастоидально (сдвоенный катод – в области лба над глазами, сдвоенный анод – позади ушных раковин). Предварительно перед установкой электродов место их установки и сами электроды обрабатывались 0,05%-ным водным раствором хлоргексидина [13]. За исключением ТЭС-терапии, все релевантные условия содержания, манипуляции и процедуры, производимые над животными основной группы и группы сравнения, были идентичны.

На 7-й и 8-й дни моделировался комбинированный стресс. Для этого использовались модифицированный тест вынужденного плавания, производимый на 7-й день, и ортостатический стресс на 8-й день. Ортостатический стресс включал в себя фиксацию крыс в специальных футлярах из оргстекла (объем  $0,75 \times 10^{-3}$  м<sup>3</sup>) вниз головой под прямым углом к горизонтальной поверхности. Ортостатический стресс сочетался, таким образом, с иммобилизацией. Время пребывания в антиортостатическом положении составляло 45 минут.

Параметры электрического тока, использующегося при проведении ТЭС-терапии в режиме анальгезии у крыс

Частота, Гц	Длительность импульса, мс	Величина суммарного тока, мА
70±2	3,75±0,25	1–2,5

Забор крови в объеме 2 мл производился через 2 часа после ортостатического стресса в вакуэты с ЭДТА (концентрация 2,7%). Перед этим животное наркотизировалось золетилом 0,8 мг на 100 г веса крысы в/м (Virbac, Франция) и ксиланитом 0,8 мг на 100 г веса крысы в/м («НИТА-ФАРМ», Россия) [13]. Глубина наркоза верифицировалась по угнетению роговичного рефлекса и исчезновению реакции на болевые раздражители.

Мононуклеарные лейкоциты выделялись градиентным центрифугированием. Для этого кровь (1 мл) разбавлялась 1 мл физиологического раствора и наслаивалась на фиколл-верографиновый градиент плотности ( $\rho=1087 \text{ кг/м}^3$ ) в соотношении 1:1, после чего производилось центрифугирование в течение 20 минут при 2000 об/мин. Отбиралось интерфазное кольцо мононуклеаров. Клетки осаждались центрифугированием в течение 5 минут при 2000 об/мин с последующим удалением надосадочной жидкости.

Экспрессия гена *c-fos* оценивалась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Выделение РНК из мононуклеарных лейкоцитов осуществлялось методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с использованием коммерческого набора ExtractRNA («Евроген», Россия). Концентрацию РНК измеряли при помощи спектрофотометра Picodrop Pico200 (PicodropLtd, UK). Целостность выделенной РНК изучалась при помощи электрофореза в агарозном геле с бромистым этидием.

Для обратной транскрипции на матрице полученной РНК использовался коммерческий набор MMLV RT kit («Евроген», Россия) по инструкции производителя. Определение уровня мРНК гена интереса и референтного гена (*actb*) проводилось с использованием наборов TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA) *c-fos*:Rn02396759\_m1, *beta-actin*: Rn00667869\_m1 (краситель – FAM, гаситель – BHQ).

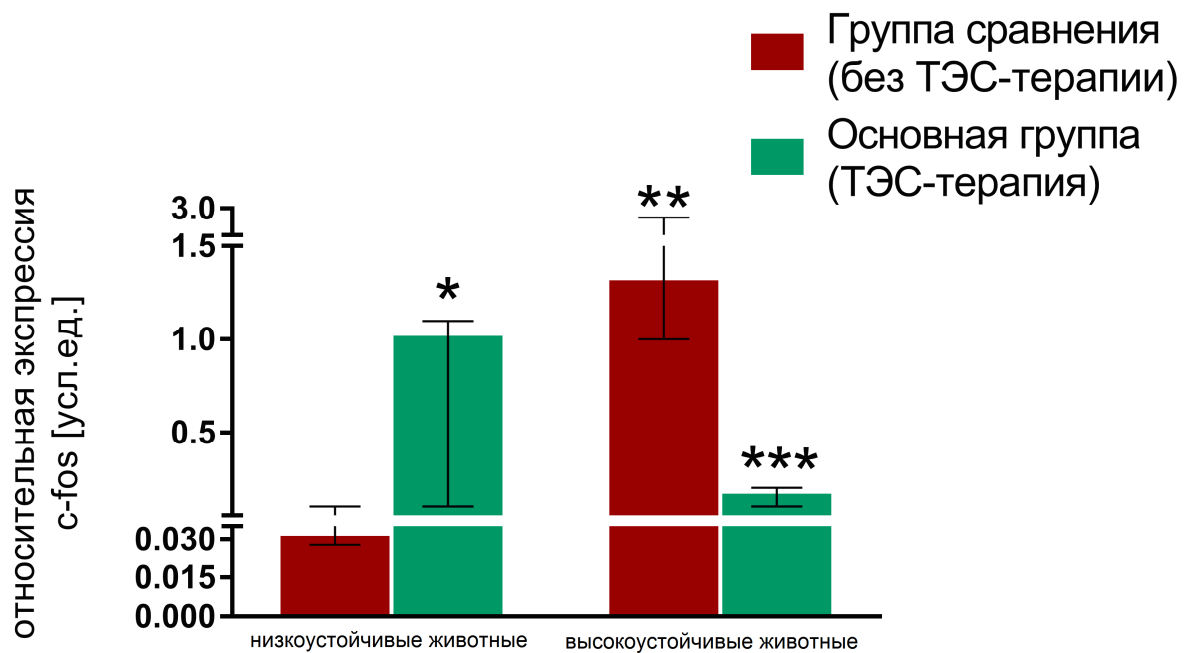
Аmplификационная смесь общим объемом 25 мкл, содержащая 1×TaqMan Gene Expression MasterMix (Applied Biosystems, USA), 1×TaqMan Gene Expression Assays и 5 мкл

кДНК, помещалась в прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени (Rotor-Gene Q-series, Qiagen, Germany). Режим ПЦР состоял из 2-минутного прогревания смеси при 50 °С (для активации урацил-N-гликозилазы), 10-минутного прогрева при 95 °С (активация полимеразы) с последующими 60 циклами: 12 сек денатурации при 95 °С, 30 сек отжига праймеров при 56 °С и 20 сек элонгации при 72 °С. Описанный состав реакционной смеси и режим амплификации были подобраны в ходе предварительной оптимизации. Расчет относительной экспрессии гена *c-fos* осуществлялся по Livak [14].

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 как  $Me(Q_1-Q_3)$ , где  $Me$  – медиана,  $Q_1-Q_3$  – нижний (25%) и верхний (75%) квартили. Для выполнения задачи сравнения двух независимых групп использовался непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы принимался равным 0,01 (с учетом проблемы множественных сравнений).

### **Результаты и обсуждение**

Экспрессия гена *c-fos* в исследуемых клетках была ниже экспрессии гена  $\beta$ -актина во всех случаях. Эффективность амплификации кДНК гена интереса и референтного гена была равной (необходимое условие использования метода Livak). Относительная экспрессия гена *c-fos* в подгруппе низкоустойчивых животных группы сравнения составила 0,03(0,028–0,1) и была статистически значимо меньше ( $p=0,002$ ), чем в высокоустойчивой подгруппе (1,3(1–2,9)). Применение ТЭС-терапии сопровождалось статистически значимым ( $p=0,008$ ) увеличением медианы относительной экспрессии гена *c-fos* до уровня, сопоставимого с интактным (1(0,1–1,1)) в подгруппе низкоустойчивых животных (рисунок). Таким образом, одним из эффектов данного лечебного метода является благоприятное воздействие на процесс адаптации мононуклеарных лейкоцитов в условиях жесткого комбинированного стресса. В подгруппе высокоустойчивых животных применение ТЭС-терапии сопровождалось статистически значимым ( $p=0,002$ ) снижением уровня относительной экспрессии гена *c-fos* (0,15(0,1–0,2)). В данном случае имело место предупреждение и подавление мальадаптивной стресс-индуцированной гиперактивации гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах.



*Уровень экспрессии гена c-fos в мононуклеарных лейкоцитах низко- и высокоустойчивых животных основной группы и группы сравнения относительно интактной группы*

Примечание: \*  $p=0,008$  - по сравнению с низкоустойчивыми животными группы сравнения (без ТЭС-терапии); \*\*  $p=0,002$  - по сравнению с низкоустойчивыми животными группы сравнения (без ТЭС-терапии); \*\*\*  $p=0,002$  - по сравнению с высокоустойчивыми животными группы сравнения (без ТЭС-терапии).

Индивидуальная стрессоустойчивость является значимым фактором, влияющим на характер физиологических изменений при стрессе. У крыс с различной стрессоустойчивостью обнаруживаются значимые отличия в концентрации плазменного кортикостерона, электрической активности мозга, медиаторном обеспечении стресс-реактивных центров [9]. К примеру, содержание моноаминов в гипоталамусе у высокоустойчивых животных выше, а содержание дофамина в стволовых структурах ниже, чем у низкоустойчивых [9]. В зависимости от стрессоустойчивости разнятся также паттерны активации нейронов стресс-реализующих систем. В паравентрикулярном ядре гипоталамуса после иммобилизации у высокоустойчивых животных наблюдается значительно больше Fos-положительных клеток по сравнению с низкоустойчивой группой. Эти изменения, отражающие первый этап активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, в свою очередь, связаны с разным содержанием моноаминов и глутамата в указанных структурах мозга [9]. Аналогичные паттерны активации – большее количество Fos-положительных клеток в группе резистентных животных – имеют место также в лимбических структурах при стрессе [15]. Таким образом, многие значимые стресс-индуцируемые изменения в организмах низко- и высокоустойчивых животных имеют противоположную направленность [8]. При этом гипореактивность является характерным

свойством низкоустойчивых организмов. Особое значение поэтому имеет детальное изучение стресс-лимитирующих лечебных методов, обладающих гомеостатическим характером действия.

### **Заключение**

Уровень экспрессии генов стресса мононуклеарными лейкоцитами крови в значительной мере зависит от индивидуальной стрессоустойчивости организма. Так, низкоустойчивые животные в настоящем исследовании демонстрировали низкий уровень экспрессии гена *c-fos*, который является одним из проявлений характерной для подобных организмов гипореактивности. Напротив, в мононуклеарных лейкоцитах высокоустойчивых животных имела место стресс-индуцированная гиперактивация гена *c-fos*. В подгруппе низкоустойчивых животных использование ТЭС-терапии сопровождалось повышением экспрессии гена *c-fos* до уровня, сопоставимого с интактным. В подгруппе высокоустойчивых животных применение ТЭС-терапии предупреждало и подавляло мальадаптивную стресс-индуцированную гиперактивацию гена *c-fos*. Эти эффекты являются проявлением системного благоприятного стресс-лимитирующего влияния ТЭС-терапии на нейроиммуноэндокринную систему, имеющего выраженный гомеостатический характер.

### **Список литературы**

1. Динамика уровня β-эндорфина при моделировании ишемического инсульта у крыс / Трофименко А.И. [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2014. – №. 3. – С. 115-118.
2. β-эндорфин и цитокиновый профиль в динамике экспериментального ишемического инсульта / Трофименко А.И. [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – №. 6. - URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=16368> (дата обращения: 01.12.2017).
3. Влияние ТЭС-терапии на показатели системы про/антиоксиданты у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом / Левичкин В.Д. и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – №. 2. - URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=12581> (дата обращения: 01.12.2017).
4. 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.
5. Характер экспрессии *c-fos* нейронами медиальной префронтальной коры в условиях

- комбинированного стресса и влияния ТЭС-терапии / А.Х. Каде [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 5. - URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26877> (дата обращения: 05.11.2017).
6. Teyssier J.R., Trojak B., Chauvet-Gelinier J.C., Bonin B. Low frequency transcranial magnetic stimulation downregulates expression of stress genes in blood leucocytes: Preliminary evidence // *J. Psychiatr. Res.* – 2013. – Vol. 47. – № 7. – P. 935-936.
  7. Gladkevich A., Kauffman H.F., Korf J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* – 2004. – Vol. 28. – № 3. – P. 559-576.
  8. Поляков П.П. Механизмы активации и функционирования некоторых генов раннего ответа / П.П. Поляков, А.С. Липатова, А.Х. Каде // *Медицинский вестник Юга России.* – 2016. - № 4. – С. 1-11.
  9. Umriukhin P.E., Koplik E.V., Sudakov K.V. Dizocilpine and cycloheximide prevent inhibition of c-Fos gene expression by delta sleep-inducing peptide in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats with different resistance to emotional stress // *Neurosci. Lett.* – 2012. – Vol. 506. – № 2. –P. 184-187.
  10. Kilkenny C. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines / C. Kilkenny, W. Browne, I.C. Cuthill [et al.] // *Brit. J. pharmacol.* – 2010. – Vol. 160. – № 7. – P. 1577-1579.
  11. Bustin S.A. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments / S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson [et al.] // *Clin. chem.* – 2009. – Vol. 55. – № 4. – P. 611-622.
  12. Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине / В.Н. Каркищенко [и др.] // *Биомедицина.* – 2012. – № 4. – С. 15-21.
  13. 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: 05.11.2017).
  14. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method // *Nat. protoc.* – 2008. – Vol. 3. – № 6. – P. 1101-1108.
  15. Sudakov K.V., Umriukhin R., Koplik E.V., Anokhin K.V. Delta-sleep inducing peptide (DSIP) and ACTH (4-10) analogue influence fos-induction in the limbic structures of the rat brain under emotional stress // *Stress.* – 2001. – Vol. 4. – № 2. – P. 143-153.