

П. П. ПОЛЯКОВ ¹, А. А. АГУМАВА ², Л. Р. ГУСАРУК ¹, А. С. ЛИПАТОВА ¹, О. В. ЦЫМБАЛОВ ¹,
Н. В. ЗАБОЛОТСКИХ ¹, С. П. ВЧЕРАШНЮК ¹, С. В. КРАВЧЕНКО ¹, А. Х. КАДЕ ¹

КОРРЕКЦИЯ ТЭС-ТЕРАПИЕЙ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ C-FOS МОНОНУКЛЕАРНЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ КРЫС

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Седина, д. 4, Краснодар, Россия, 350063.

²ФГБНУ «НИИ Медицинской Приматологии», ул. Мира, д. 177, с. Веселое, Сочи, Адлерский район, Россия, 354376.

АННОТАЦИЯ

Цель. В настоящей работе изучена возможность коррекции транскраниальной электростимуляцией (ТЭС-терапией) индуцированных комбинированным стрессом нарушений экспрессии гена *c-fos* мононуклеарными лейкоцитами крови крыс определенной стрессоустойчивости.

Материалы и методы. В качестве модели комбинированного стресса в настоящей работе использовались тест принудительного плавания и ортостатический стресс. Для оценки индивидуальной стрессоустойчивости применялся тест принудительного плавания. Оценка уровня экспрессии гена *c-fos* мононуклеарными лейкоцитами крови осуществлялась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Усиление экспрессии генов раннего ответа, в первую очередь гена *c-fos*, является маркером стресса, а также стресс-ассоциированных и психиатрических заболеваний.

Результаты. Экспрессия *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах животных группы сравнения превышала показатели интактной группы. Напротив, применение ТЭС-терапии (в основной группе) сопровождалось статистически значимым ($p=0,04$) снижением медианы относительной экспрессии исследуемого гена (медиана группы сравнения – 1,8; медиана основной группы – 0,6).

Заключение. Полученные результаты отражают стресс-лимитирующий эффект ТЭС-терапии, соотносятся с выводами предыдущих экспериментальных и клинических работ.

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

Для цитирования: Поляков П.П., Агумава А.А., Гусарук Л.Р. и др. Коррекция ТЭС-терапией стресс-индуцированных нарушений экспрессии *c-fos* мононуклеарными лейкоцитами крыс. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2017; 24(6): 106-109. DOI: 10.25207 / 1608-6228-2017-24-6-106-109

For citation: Polyakov P.P., Agumava A.A., Gusaruk L.R., Lipatova A.S., Tsybalov O.V., Zabolotskih N.V., Vcherachnyuk S.P., Kravchenko S.V., Kade A.Kh. Cranial electrotherapy stimulation modulates stress-induced *c-fos* expression in rat peripheral blood mononuclear cells. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik*. 2017; 24(6): 106-109. (In Russ., English abstract). DOI: 10.25207 / 1608-6228-2017-24-6-106-109

**P. P. POLYAKOV ¹, A. A. AGUMAVA ², L. R. GUSARUK ¹, A. S. LIPATOVA ¹, O. V. TSYMBALOV ¹,
N. V. ZABOLOTSKIH ¹, S. P. VCHERACHNYUK ¹, S. V. KRAVCHENKO ¹, A. KH. KADE ¹**

CRANIAL ELECTROTHERAPY STIMULATION MODULATES STRESS-INDUCED C-FOS EXPRESSION
IN RAT PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Sedina str., 4, Krasnodar, Russia, 350063.

²Research Institute of Medical Primatology, Mira str., 177, s. Veseloe, Sochi, Russia, 354376.

ABSTRACT

Aim. In our article, we studied the possibility of remodeling of stress-induced *c-fos* expression damages in rat peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) by cranial electrotherapy stimulation (CES-therapy).

Materials and methods. As a model of combined stress, the present study used a forced swimming test and orthostatic stress. For the assessment of individual stress resistance, a forced swimming test was used. Evaluation of the *c-fos* gene expression level in PBMNC was carried out by real-time polymerase chain reaction. Leukocyte expression of *c-fos* is a recognized and unique peripheral biomarker of the psychogenic and somatic stress.

Results. The use of CES-therapy was followed by a decrease ($p=0,04$) in the expression of the *c-fos* gene in PBMNC (0,6 as the median of treatment group vs 1,8 as median of control group).

Conclusion. These results reflect the stress-limiting effect of this treatment method and correlate with the findings of previous experimental and clinical studies.

Keywords: *c-fos*, mononuclear leukocytes, forced swimming test, orthostatic stress, CES-therapy

Введение

Транскраниальная электростимуляция (ТЭС-терапия), усиливая продукцию β -эндорфина, оказывает гомеостатическое антистрессорное влияние на нейроиммуноэндокринную регуляцию. Доказательства антистрессорного потенциала данного метода получены в ряде экспериментальных и клинических работ [1, 2]. При этом практически не проясненным остается вопрос о влиянии ТЭС-терапии на экспрессию так называемых генов стресса (в первую очередь *c-fos*) мононуклеарными лейкоцитами крови. Между тем, усиление данной экспрессии является уникальным маркером стресса как нейроиммуноэндокринного ответа на требования среды и стресса клеточного [3]. Более того, активация генов немедленного ответа, к которым относится *c-fos*, представляет собой связующее патогенетическое звено двух этих уровней, являясь одним из ранних этапов процесса изменения фенотипа клетки [4]. В свете сказанного чрезвычайно актуальным представляется вопрос о возможности коррекции ТЭС-терапией стресс-индуцированных нарушений экспрессии *c-fos* мононуклеарными лейкоцитами крови. Особый интерес представляет при этом использование модели комбинированного стресса, как наиболее приближенной к условиям, имеющим место *in natura*.

Цель исследования: изучить возможности коррекции ТЭС-терапией стресс-индуцированных нарушений экспрессии *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах крови крыс определенной стрессоустойчивости.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись 50 нелинейных белых самцов крыс (200-250г). Содержание крыс, постановка экспериментов, представление полученных результатов проводились согласно требованиям приказа №199н МЗ РФ от 01.04.2016г., рекомендациям ARRIVE (Animal Research: Reporting of InVivo Experiments, 2010) и MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, 2009).

Время адаптации для животных всех групп составляло 7 дней. Крысы интактной группы не включались в эксперимент. Забор крови (2 мл) производился в первый день после адаптации. Ранжирование остальных крыс по выносливости, работоспособности и стрессоустойчивости осуществлялось в первый день после адаптации при помощи модифицированного НЦБМТ РАМН (Научный центр биомедицинских технологий) теста принудительного плавания (плавательного теста)

по методике, описанной нами ранее [1, 2]. В эксперимент включались среднеустойчивые крысы (время плавания до утомления не отклонялось от среднего более чем на 35%). Учет индивидуальной стрессоустойчивости является ключевым методологическим приемом посвященных стрессу исследований, пренебрежение которым может исказить конечные результаты. Половина среднеустойчивых животных (основная группа, $n=20$) получала ТЭС-терапию со 2 по 6 день по методике, описанной нами ранее [5]. Другая половина (группа сравнения, $n=20$) не получала ТЭС-терапию.

После этого моделировался комбинированный стресс (модифицированный тест принудительного плавания на 7 день и ортостатический стресс на 8 день) по методике, описанной нами ранее [1, 2].

Забор крови в объеме 2 мл производился через 2 часа после ортостатического стресса в вакуэты с ЭДТА (концентрация 2,7%). Перед этим животное наркотизировалось телазолом («Zoetis Inc», USA) и ксиланитом («Нита-Фарм», Россия) [5]. 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 в реальном времени (ПЦР-РВ). 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 Реверта-Л (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) по инструкции производителя. Определение уровня мРНК гена интереса – *c-fos*, и референтного гена – β -актина проводилось с использованием наборов TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA) *c-fos*:Rn02396759_m1, *beta-actin*: Rn00667869_m1 (краситель – FAM, краситель – BHQ).

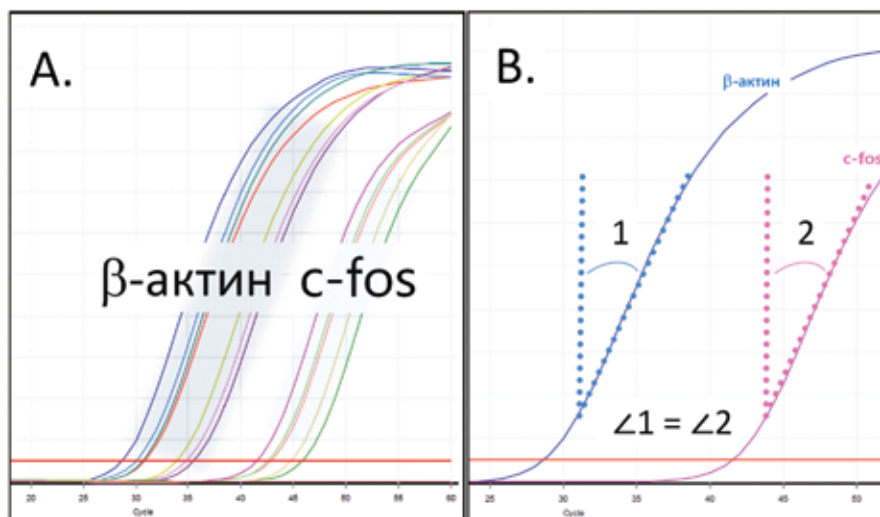


Рис. 1. Примеры флюоресцентных кривых амплификации кДНК генов β -актина и *c-fos*. А. – экспрессия *c-fos* была ниже экспрессии гена β -актина во всех случаях. В. – равный угол наклона флюоресцентных кривых амплификации кДНК генов β -актина и *c-fos*.

Fig. 1. Examples of PCR amplification curves. А. – *c-fos* expression was lower than the expression of β -actin gene in all cases. В – equal inclination angle of PCR amplification curves.

Амплификационная 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 («Qiagen», Germany). Режим включал в себя прогревание смеси при 50°C в течение 2 минут (для активации урацил-N-гликозилазы), 10-минутного прогрева при 95°C (активация полимеразы) с последующими 60 циклами: 12 сек денатурации при 95°C, 30 сек отжига праймеров при 56°C и 20 сек элонгации при 72°C. Описанный состав реакционной смеси и режим амплификации были подобраны в ходе предварительной оптимизации. Расчет относительной экспрессии гена *c-fos* осуществлялся методом $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась посредством программы Statistica («StatSoft Inc», USA). Для оценки нормальности распределения полученных значений использовался критерий Шапиро-Уилка. Так как распределение отличалось от нормального, данные представлялись как $Me(Q_1-Q_3)$, где Me – медиана, Q_1-Q_3 – нижний (25%) и верхний (75%) квартили. Сравнение двух независимых групп осуществлялось при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни. В качестве критического принимался уровень значимости нулевой гипотезы, равный 0,05.

Результаты и обсуждение

Экспрессия *c-fos* в исследуемых клетках была ниже экспрессии гена β -актина во всех случаях (рис. 1А). Эффективность амплификации кДНК гена интереса и референтного гена была равной (необходимое условие использования метода Livak (рис. 1В)). Экспрессия *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах животных группы сравнения

превышала показатели интактной группы (1,8(1,3-2,8)). Эти результаты отражают индуцированную комбинированным стрессом чрезмерную активацию *c-fos*. Применение ТЭС-терапии сопровождалось статистически значимым ($p=0,04$) снижением медианы относительной экспрессии исследуемого гена (0,6(0,09-1)) (рис. 2).

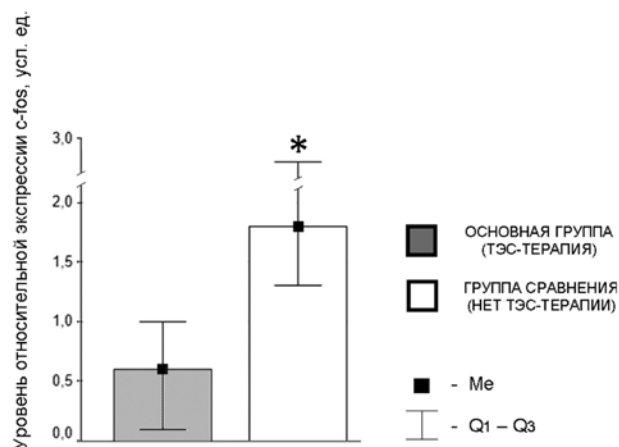


Рис. 2. Уровень экспрессии *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах животных групп сравнения и основной относительно интактной группы.

* $p=0,04$ – по сравнению с основной группой.

Fig. 2 Relative expression levels of *c-fos* in the treatment and control groups.

* $p=0,04$ – vs. treatment group.

Экспрессия *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах при стрессе имеет характерную динамику. Вне воздействия каких-либо стрессоров (к примеру, у здоровых добровольцев) обнаруживается незначительный ее уровень. В условиях стресса количество мРНК данного гена быстро увеличивается и затем через 4-5 часов снижается вплоть до нерегистри-

руемого уровня, что объясняется стресс-индуцируемым угнетением пролиферации лимфоцитов и многочисленными ограничивающими транскрипцию механизмами отрицательной обратной связи [6]. Благодаря данным свойствам, усиление экспрессии *c-fos* рассматривается в современной литературе как перспективный биомаркер стресса, отражающий к тому же интенсивность клеточного стресса и провоспалительный статус [4]. В последнее время предпринимаются попытки использовать этот инструмент для оценки выраженности стресс-ассоциированных и психиатрических заболеваний, лекарственных и наркотических аддикций, а также эффективности терапевтических стратегий. К недавним успехам данного направления следует отнести результаты исследования Teyssier (2013), касающиеся способности транскраниальной магнитной стимуляции угнетать экспрессию *c-fos* мононуклеарными лейкоцитами пациентов, страдающих большим депрессивным расстройством [4].

Результаты настоящей работы согласуются с выводами предшествующих исследований, демонстрирующих антистрессорные эффекты ТЭС-терапии, в частности, способность данного лечебного метода предупреждать и подавлять гиперактивацию важнейших стресс-респонсивных центров мозга – кортиколиберин-продуцирующих нейронов гипоталамуса и префронтальной коры [1, 2]. Показанное в данной работе значительное снижение экспрессии *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах животных основной группы отражает системный благоприятный характер действия ТЭС-терапии.

Заключение

В настоящей работе продемонстрирована возможность коррекции ТЭС-терапией стресс-индуцированных нарушений экспрессии *c-fos* мононуклеарными лейкоцитами крыс. Это закладывает теоретический фундамент для дальнейших экспериментальных и клинических исследований с использованием *c-fos* в качестве инструмента более тонкого изучения антистрессорных механизмов действия ТЭС-терапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Каде А.Х., Поляков П.П., Липатова А.С. и др. Характер экспрессии *c-fos* нейронами медиальной префронтальной

коры в условиях комбинированного стресса и влияния ТЭС-терапии. *Современные проблемы науки и образования*. 2017; 5. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26877>. DOI: 10.17513/spno.26877. [Kade A.Kh., Polyakov P.P., Lipatova A.S., Sotnichenko A.S., Kuevda E.V., Gubareva E.A. Stress-induced *c-fos* expression in medial prefrontal cortex and influence of tes-therapy. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2017; 5. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26877>. (In Russ., English abstract). DOI: 10.17513/spno.26877].

2. Поляков П.П., Липатова А.С., Сотниченко А.С., Кувейда Е.В., Гаспарян К.К., Губарева Е.А., Каде А.Х. Влияние ТЭС-терапии на характер стресс-индуцированной экспрессии *c-fos* нейронами паравентрикулярного ядра гипоталамуса. *Уральский медицинский журнал*. 2017; 5: 121-126. [Polyakov P.P., Lipatova A.S., Sotnichenko A.S., Kuevda E.V., Gasparyan K.K., Gubareva E.A. Kade A.Kh. Influence of TES-therapy on the character of stress-induced expression of *c-fos* in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Ural'skiy medicinskiy zhurnal*. 2017; 5: 121-126. (In Russ., English abstract)].

3. 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; 47(7): 935-936. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2013.03.002.

4. Поляков П.П., Липатова А.С., Каде А.Х. Механизмы активации и функционирования некоторых генов раннего ответа. *Медицинский вестник Юга России*. 2016; 4: 4-11. DOI: 10.21886/2219-8075-2016-4-4-11. [Polyakov P.P., Lipatova A.S., Kade A.Kh. Mechanisms of immediate-early genes activation. *Medical Herald of the South of Russia*. 2016; 4: 4-11. (In Russ., English abstract). DOI: 10.21886/2219-8075-2016-4-4-11].

5. Липатова А.С., Поляков П.П., Каде А.Х. и др. Модификация методики ТЭС-терапии для ее применения у мелких лабораторных грызунов. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 5. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22696>. [Lipatova A.S., Polyakov P.P., Kade A.Kh., Zanin S.A., Trofimenko A.I., Malysheva T.V. Modification of the procedure TES-therapy for its use in small laboratory rodents. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; 5. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22696>. (In Russ., English abstract)].

6. 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; 28(3): 559-576. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2004.01.009.

Поступила / Received 30.10.2017

Принята в печать / Accepted 28.11.2017

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflict of interest

Контактная информация: Поляков Павел Павлович; тел.: 8 (861) 262-40-31; e-mail: palpal.p@yandex.ru; Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, д. 4.

Corresponding author: Pavel P. Polyakov; tel.: 8 (861) 262-40-31; e-mail: palpal.p@yandex.ru; Sedina street, 4, Krasnodar, Russia, 350063.