

Поляков П.П., Липатова А.С., Сотниченко А.С., Куведва 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

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар

Polyakov P.P., Lipatova A.S., Sotnichenko A.S., Kuevda E.V., Gasparyan K.K., Gubareva E.A., Kade A.H.

### Influence of TES-therapy on the character of stress-induced expression of C-FOS in the paraventricular nucleus of the hypothalamus

#### Резюме

В настоящем исследовании оценивалась способность транскраниальной электростимуляции (ТЭС-терапии) предотвращать гиперактивацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) оси (отражающуюся в изменении характера экспрессии c-fos нейронами паравентрикулярного ядра гипоталамуса) в условиях комбинированного стресса, в качестве модели которого использовались тест вынужденного плавания и ортостатический тест. С этой целью экспериментальные животные были разделены на две группы: подвергавшиеся стрессу (группа сравнения, n=20) и подвергавшиеся стрессу и получавшие ТЭС-терапию (основная группа, n=20). Результаты исследования указывают на то, что ТЭС-терапия благоприятно воздействует на психофизические показатели крыс и отрицательно модулирует функцию ГГН оси. Это позволяет заключить, что данная методика является эффективным подходом к лечению ассоциированных со стрессом расстройств.

**Ключевые слова:** ТЭС-терапия, тест вынужденного плавания, ортостатический стресс, паравентрикулярное ядро, c-fos

#### Summary

In this study, the ability of transcranial electrostimulation (TES-therapy) to inhibit the hyperactivation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis (reflected in the change in the character of c-fos expression by neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus) under conditions of combined stress and orthostatic test was evaluated. The experimental animals were divided into two groups: subjected to stress (comparison group, n = 20) and subjected to stress under TES-therapy (main group, n = 20). The results of the study indicate that TES-therapy favorably affects the psychophysical characteristics of rats and negatively modulates the function of the HPA axis, which allows us to conclude that this technique is an effective approach to the treatment of stress-related disorders.

**Key words:** TES-therapy, forced swimming test, orthostatic stress, paraventricular nucleus, c-fos

#### Введение

Транскраниальная электростимуляция (ТЭС-терапия) – это воздействие электрическим током через покровы черепа на головной мозг, приводящее к селективной активации структур, относящихся к антиноцицептивной системе ствола мозга. Системное стресс-лимитирующее, воздействие ТЭС-терапии на нейроиммуноэндокринную регуляцию объясняется усилением синтеза и секреции β-эндорфина, а также модуляцией работы серотонинергического, дофаминергического и холинергического механизмов [1, 2]. Важнейшим инструментом, помогающим оценить антистрессорное влияние ТЭС-терапии, является исследование экспрессии гена c-fos нейронами стресс-реализующих систем. C-Fos

картирование является хорошо изученным и чувствительным методом изучения активации нейронов при разнообразных воздействиях [3]. Так, например, усиление экспрессии c-fos парвоцеллюлярными нейронами паравентрикулярного ядра (ПВЯ), важнейшей части гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) оси, рассматривается как маркер наличия и интенсивности стресса и широко используется в соответствующих исследованиях. Работ, посвященных возможностям ТЭС-терапии угнетать стресс-индуцированную экспрессию c-fos, немного, а их результаты не охватывают чрезвычайно многообразные потенциальных стрессоров и условий возникновения стресса [1]. Между тем, от характера стрессора зависят особенности стресс-индуцированной экспрессии c-fos.

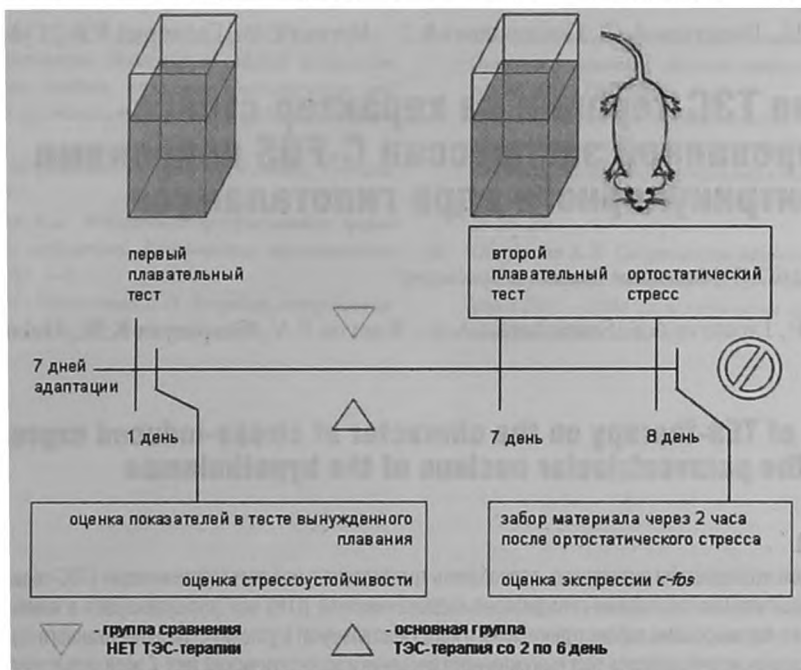


Рисунок 1. Схема эксперимента. Пояснения в тексте.

Так, например, описаны, значимые различия в последовательности и характере активации структур мозга при разных видах стресса, что не отрицает, а скорее детализирует тезис об известной однотипности стресс-реакции, постулированный Г. Селье [4]. Несмотря на многочисленные исследования данного вопроса, существует необходимость дополнить представления о влиянии типа стрессора на паттерны активации нейронов центральных стресс-реализующих систем и благоприятном эффекте ТЭС-терапии, в первую очередь, используя модель комбинированного стресса, исключительно часто имеющего место *in natura*.

**Целью** нашей работы является изучение влияния ТЭС-терапии на характер экспрессии *c-fos* нейронами стресс-реактивных структур.

## Материалы и методы

Объектами исследования были 50 взрослых белых нелинейных крыс-самцов массой 200-250г. Содержание животных и постановка экспериментов проводились в соответствии с требованиями приказа МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 года, и требованиями Женевской конвенции "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" (Geneva, 1990). Крысы содержались в клетках (по 5 животных в клетке) со свободным доступом к воде и пище, при комнатной температуре, в условиях естественного освещения.

Период адаптации перед экспериментом для крыс всех групп составлял 7 дней. Животные интактной группы (n=5) не включались в эксперимент, забор материала производился в первый день после адаптации. Оценка выносливости, работоспособности и стрессоустойчиво-

сти остальных крыс производилась в первый день после адаптации.

Для этого использовался модифицированный НЦБМТ РАМН (Научный центр биомедицинских технологий) тест вынужденного плавания (плавательный тест) [5]. Методика заключалась в том, что стеклянный аквариум, квадратный в сечении (длина стороны 30 см), заполнялся водой (высота водного столба 40 см, температура воды 28°C). 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 всплыть на поверхность и адинамия более 10 секунд [5]. Оценка стрессоустойчивости осуществлялась по времени плавания до утомления. В эксперимент включались крысы, длительность плавания которых не отклонялась от среднего более чем на 35% [5,6]. Оценка индивидуальной устойчивости к стрессу является важным этапом исследований, посвященных стрессу, а пренебрежение данным методологическим приемом может привести к искажению результатов и потере информации [3]. Одна группа отобранных животных получала ТЭС-терапию со 2 по 6 день ежедневно по одному сеансу в день (основная группа, n=20), а другая (группа сравнения, n=20) – крысы, которым ТЭС-терапия не проводилась (рисунок 1). Манипуляции, процедуры, производимые с животными обеих групп, равно как и релевантные условия содержания и проведения экспериментов, были идентичны, за исключением использования ТЭС-терапии. ТЭС-терапия проводилась по методике, описанной нами ранее [7]. Таким образом, были сформированы 3 группы: интактная, сравнения и основная.

На 7 и 8 дни моделировался комбинированный стресс. Для этого использовались тест вынужденного плавания в модификации НЦБМТ РАН, производимый на 7 день, и, на 8 день, ортостатический стресс, который включал в себя фиксацию крысы в специальном футляре из оргстекла (объем 0,75 × 10-3 м3) вниз головой под прямым углом к горизонтальной поверхности, сочетаясь, таким образом, с иммобилизацией. Время пребывания в антиортостатическом положении составляло 45 минут.

Через 2 часа после ортостатического стресса производился забор материала. Перед этим животное наркотизировали, используя золетил 0,8 мг на 100 г веса крысы в/м (Virbac, France), ксилант 0,8 мг на 100 г веса крысы в/м (ЗАО «НИТА-ФАРМ», Россия) [8]. Глубину наркоза верифицировали по угнетению роговичного рефлекса и исчезновению реакции на болевые раздражители.

Оценка экспрессии c-fos в ПВЯ производилась иммуногистохимическим методом. После извлечения головной мозг фиксировался иммерсионным методом в 10% нейтральном забуференном формалине. Дегидратация и заключение в парафин осуществлялось 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. Эндogenous пероксидазная активность блокировалась добавлением 3% раствора H2O2. Температурное восстановление эпитопа осуществлялось экспозицией в растворе Access Rodent (Menarino diagnostics, Italy) при температуре 95°C

(40 минут). Неспецифическая иммуореактивность 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 конъюгированный с пероксидазой стрептавидина (ab64261, Abcam, UK) на 10 минут при комнатной температуре. Затем срезы промывались 4 раза, и добавлением на 5 минут хромогена диаминобензидина выявлялся белок интереса. После этого производилась четырехкратная отмывка фосфатным буферным раствором, контрастирующее окрашивание, дегидратация в спиртах восходящей концентрации и ксилоле и заключение срезов монтирующую среду ConsulMount (Thermo Fisher Scientific, USA). Реакция считалась положительной при появлении коричневой окраски.

Идентификацию уровней срезов и границ анатомических структур осуществляли при помощи стереотаксических атласов мозга крысы [9]. Изучение срезов и получение фотографий проводилось с помощью микроскопа Olympus IX51 (Olympus, Japan). Изображения, имеющие одинаковые увеличение (20×) и разрешение, сохраня-

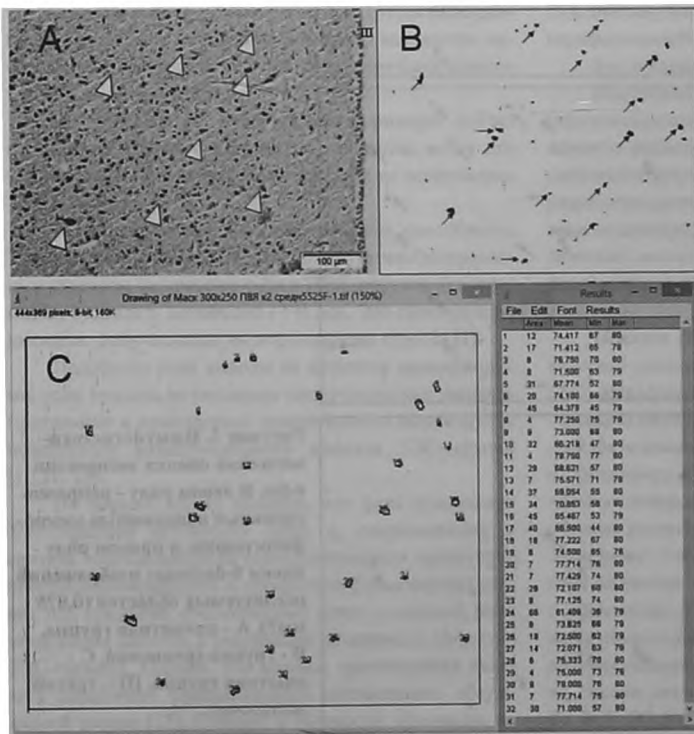


Рисунок 2. Этапы морфометрического анализа изображений. А. Объектив 20. Репрезентативная панорамная микрофотография иммуоокрашивания по c-Fos в ПВЯ. Белыми треугольниками указаны примеры Fos-положительных клеток. III – третий желудочек. В. Маска 8-битового изображения исследуемой области (0,075 мм2) ПВЯ крысы, преобразованного (Threshold) при помощи программы ImageJ 1.50i. Стрелками отмечены примеры частиц размером более 4 пикселей (8,9 мкм2). С. Результат автоматического морфометрического анализа (Analyze Particles) с указанием числа и размера объектов.

**Таблица 1. Количество иммунореактивных клеток в исследуемых областях.**

Показатель/группы	Группа сравнения	Опытная группа
Me (25%-75%)	34,5 (30-45)	18* (17-19)

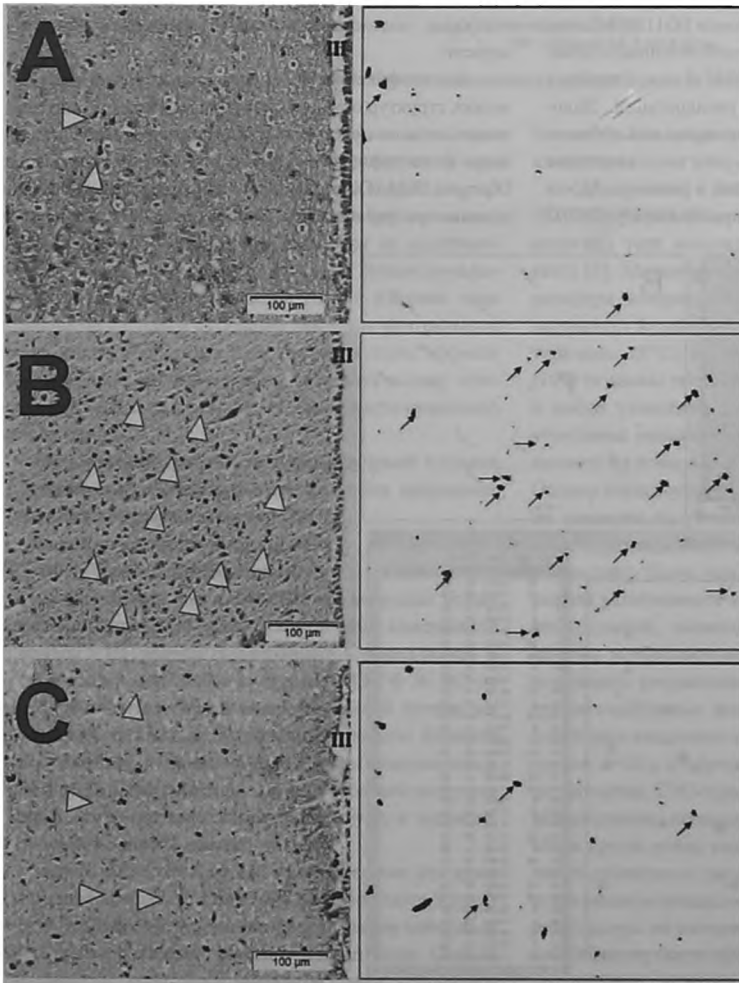
\* -  $p=0,002$

лись 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.

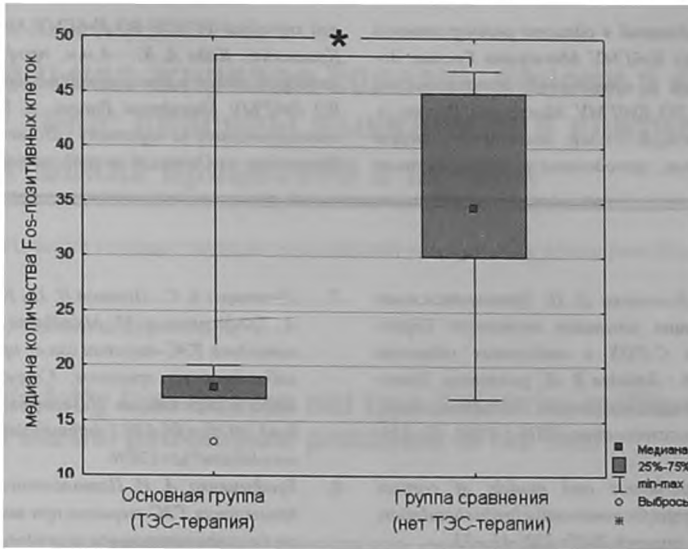
Подсчет иммунореактивных ядер в ПВЯ производился на площади 0.075 мм<sup>2</sup> (0,25 мм × 0,3 мм). Для морфометрического анализа изображения использовалось программное обеспечение с открытым исходным кодом ImageJ 1.50i (National Institutes of Health, USA). После преобразования (Threshold) 8-битовых изображений в маски, производился автоматический подсчет частиц (Analyze Particles). Учитывались частицы размером более 4 пикселей, соответствовавших 8,9 мкм<sup>2</sup> на реальном

препарате (рисунок 2). Автоматический анализ дополнялся ручным методом. Исследователь, производивший подсчет, не имел информации о принадлежности крысы к той или иной группе.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета программ STATISTICA (Statsoft, USA). Гипотеза о виде распределения проверялась посредством критерия Шэпиро-Уилка. Поскольку закон распределения полученных значений отличался от нормального, данные представлялись в виде медианы (Me) и квартильных интервалов (25% и 75%), а для выполнения основной задачи сравнения двух независимых групп использовался непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Критический уровень значимости нулевой



**Рисунок 3. Иммуногистохимическая оценка экспрессии c-fos. В левом ряду - репрезентативные панорамные микрофотографии, в правом ряду - маски 8-битовых изображений исследуемых областей (0,075 мм<sup>2</sup>). А - интактная группа, В - группа сравнения, С - опытная группа. III – третий желудочек.**



**Рисунок 4.** Влияние ТЭС-терапии на экспрессию c-fos в нейронах ПВЯ гипоталамуса. Количество c-Fos-позитивных нейронов в исследуемых областях мозга было значительно меньшим в группе животных, получавших ТЭС-терапию.\* -  $p=0,002$ .

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

## Результаты и обсуждение

Медиана количества иммунореактивных клеток в исследуемой области у крыс интактной группы была равна 12. Как следует из таблицы 1, медиана количества иммунореактивных клеток в группе сравнения была меньше таковой в основной группе.

На рисунке 3 представлены примеры c-Fos-позитивных клеток в исследуемых областях мозга интактных крыс, животных, получавших и не получавших ТЭС-терапию.

В настоящем исследовании показана способность ТЭС-терапии угнетать индуцированную комбинированным стрессом экспрессию c-fos в ПВЯ (рисунок 4) и, очевидно, подавлять активацию ГН осн. Это согласуется с данными, полученными на иных моделях стресса [1].

Подобного рода выводы не являются неожиданными, если принять во внимание многочисленные экспериментальные и клинические доказательства выраженного позитивного антистрессорного эффекта ТЭС-терапии [10,11, 12].

На первый взгляд кажется, что факт подавления ТЭС-терапией активности ПВЯ, а, следовательно, и синтеза кортиколиберина (стимулирующего процессинг проопиомеланокортина и продукцию β-эндорфина) ставит под сомнение обоснованный тезис о ведущей роли эндогенных опиатов в реализации позитивных эффектов ТЭС-терапии. Однако, это мнимое противоречие является следствием фрагментарного рассмотрения обсуждаемой теории [13]. Следует, в частности, принимать во внимание, что синтез эндогенных опиатов осуществляют

многие структуры мозга, равно как и стимуляцию секреции β-эндорфина. К примеру, и то и другое характерно для латеральных ядер гипоталамуса, активация которых ТЭС-терапией показана в предыдущих работах [1]. Кроме того, позитивный эффект ТЭС-терапии связан с модуляцией работы серотонинергического, дофаминергического и холинергического механизмов, а также с усилением периферической продукции эндогенных опиатов [1].

### Заключение

Полученные данные дополняют констелляцию экспериментальных и клинических доказательств выраженного антистрессорного потенциала ТЭС-терапии и свидетельствуют в пользу необходимости дальнейшей разработки данного вопроса, в частности, изучения влияния индивидуальной стрессоустойчивости на психофизические показатели крыс, паттерны активации стрессорночувствительных структур мозга и эффект ТЭС-терапии. ■

*Поляков П. П. – аспирант кафедры общей и клинической патологической физиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар; Липатова А. С. – аспирант кафедры общей и клинической патологической физиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар; Сотниченко А. С. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, ассистент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар; Куведва Е. В. – к.м.н., научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, ассистент кафедры оперативной хирургии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар; Губарева Е. А. – к.м.н., заведующий лабораторией фун-*

даментальных исследований в области регенеративной медицины ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, доцент кафедры общей и клинической патологической физиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар; Гаспарян К. К. – к.м.н., ассистент кафедры детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лице-

вой хирургии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар; Каде А. Х. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар; Автор, ответственный за переписку – Поляков П. П., 350063, г. Краснодар, ул.Седина,4, e-mail: palpal.p@yandex.ru

## Литература:

1. Лебедев В. П., Козловски Д. П. Транскраниальная электростимуляция унетает вызванную стрессом экспрессию C-FOS в отдельных областях мозга крыс. В сб.: Лебедев В. П., редактор. Транскраниальная электростимуляция. Экспериментально-клинические исследования. СПб.: 1998. С. 163-182.
2. Fröhlich F Experiments and models of cortical oscillations as a target for noninvasive brain stimulation. *Progress in brain research* 2015; 222: 41 - 73.
3. Umriukhin P. E., Koplík 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 *Neuroscience letters* 2012; 506(2):184-7.
4. Herman J. P., McKlveen J. M., Ghosal S. et al. Regulation of the Hypothalamic Pituitary Adrenocortical Stress Response. *Comprehensive Physiology* 2016; (6): 603-21.
5. Каркищенко В. Н., Фокин Ю. В., Казакова Л. Х., Алимкина О. В., Касинская Н. В. Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине. *Биомедицина*. 2012; (4): 15 - 21.
6. Дигурова И. И., И. И., Гуцин А. Г. Влияние стрессоустойчивости на гемореологические показатели в норме и при ортостатическом стрессе. *Ярославский педагогический вестник*. 2013; 3(1):107-11.
7. Липатова А. С., Поляков П. П., Каде А. Х., Занин С. А., Трофименко А. И., Малышева Т. В. Модификация методики ТЭС-терапии для ее применения у мелких лабораторных грызунов. *Современные проблемы науки и образования [электронный научный журнал]* 2015; (5). URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=22696>
8. Трофименко, А. И. Патогенетическое обоснование применения ТЭС-терапии при ишемическом инсульте (экспериментальное исследование) : дис. ... канд. мед. наук. Краснодар. 2014. 174с.
9. Paxinos G., Watson C. *The rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6nd ed. Elsevier; 2007.
10. Рычкова С. В. Транскраниальная электростимуляция: обоснованность применения и клиническая эффективность. 2006; (5):44 - 7.
11. Сеин Б. С. Коррекция адаптационных процессов у животных с использованием транскраниальной электростимуляции: дис. ... канд. биол. наук. Курск. 2009. 155с.
12. Трофименко А. И., Каде А. Х., Лебедев В. П. и соавт. Влияние ТЭС-терапии на исходы острого адреналинового повреждения сердца у крыс. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2013; (5): 174-180.
13. Quine W. V. Two dogmas of empiricism. In Robert J. Stainton, editor. *Perspectives in the Philosophy of Language: A Concise Anthology*. Broadview Press; 2000. p. 189-210.