На правах рукописи

ПОЛЯКОВ Павел Павлович

КОРРЕКЦИЯ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЙ АКТИВАЦИИ ГЕНОВ РАННЕГО ОТВЕТА У КРЫС

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Краснодар – 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России).

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Каде Азамат Халидович.

Официальные оппоненты:

Рогова Людмила Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии, заведующая кафедрой;

Бобынцев Игорь Иванович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патофизиологии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация:
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 11 сентября 2018 года в 13.00 час. на заседании диссертационного совета Д 208.038.02 на базе ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (350063, Краснодар, ул. Седина, 4, тел. (861) 2627375).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и официальном сайте (http://www.ksma.ru) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан «____» _____ 201___г.

Учёный секретарь
диссертационного совета Д208.038.02
доктор медицинских наук,
доцент Лапина Наталья Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Стресс и ассоциированные с ним заболевания являются чрезвычайно актуальной медицинской, социальной и экономической проблемой (de Vries S. et al., 2013; McEwen, 2015; Барковская А.Ю., Назарова М.П., 2014, Sandi C., Haller J., 2015). Важно отметить, что от последствий стресса страдает работоспособное население молодого и среднего возраста. Поэтому разработка профилактических и лечебных стресс-лимитирующих стратегий, а также оценка их эффективности является важнейшей задачей фундаментальной и клинической медицины. К числу перспективных методов коррекции разнообразных стресс-индуцированных нарушений относится и транскраниальная электростимуляция (ТЭС-терапия), предложенная Лебедевым В.П. и др. (1983) (Андреева И.Н., Акишина И. В., 2012; Тихомирова Н.Н., Артифексов С.Б., 2013; Сеин О.Б. и др., 2013; Байкова Е.Е., 2016; Занин С.А. и др., 2017).

Одним из наиболее удачных и широко используемых методов функционального картирования стресс-респонсивных структур мозга является изучение экспрессии генов раннего ответа, в первую очередь, гена *c-fos* (Kovacs K.J., 2008; Umriukhin P.E. et al., 2012; Саидов Х.М., Анохин К.В., 2017). Усиление его экспрессии следует рассматривать не как эпифеномен, маркирующий возбужденные нейроны (хотя это свойство *per se* чрезвычайно ценно для исследовательских задач), но как раннее звено лежащего в основе нейропластичности процесса изменения фенотипа клетки в ответ на предъявляемое требование (Kovacs K.J., 2008; Амельченко Е.М. и др., 2012).

Экспрессия генов раннего в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови, ввиду доступности последних в клинической практике, рассматривается в современной литературе как перспективный инструмент изучения стресс-ассоциированных состояний человека, сам же ген *c-fos* фигурирует в подобном контексте под названием «гена стресса» (Teyssier J-R. et al., 2013). Более того, экспрессия гена *c-fos* является связующим патогенетическим звеном нескольких измерений аллостатической нагрузки: реализации эффектов гормонов стресса и цитокинов, оксидативного стресса, клеточного и организменного старения (Gladkevich A. et al., 2004; Saliques S. et al., 2011; Teyssier J-R. et al., 2012; Teyssier J-R. et al., 2013).

Воздействие лечебного метода на экспрессию генов раннего ответа как в нейронах стресс-респонсивных структур, так и в лейкоцитах периферической крови, является, таким образом, проявлением его стресс-лимитирующего эффекта. Изучение возможностей коррекции ТЭС-терапией нарушений данной экспрессии дополняет и углубляет представления о благоприятном гомеостатическом воздействии этого лечебного метода на нейроиммуноэндокринную регуляцию.

Степень разработанности темы. Многообразные экспериментальные и клинические данные характеризуют выраженный стресс-лимитирующий потенциал ТЭС-терапии, однако ряд важных вопросов данного проблемного поля все еще нуждается в проработке (Трофименко А.И., 2014; Байкова Е.Е., 2016; Занин С.А. и др., 2017). Во-первых, существует необходимость дополнить представления об особенностях эффекта ТЭС-терапии на модели комбинированного стресса, исключительно часто имеющего место *in natura* (de Vries S. et al., 2013).

Кроме того, недостаточно изученным является влияние стрессоустойчивости на эффекты ТЭС-терапии. Между тем, различная индивидуальная реактивность является фактором, определяющим характер изменений физиологических параметров при стрессе (Рогова Л.Н. и др., 2014; Умрюхин П.Е., Григорчук О.С., 2015). Таким образом, оценка стрессоустойчивости является чрезвычайно важным этапом клинических и экспериментальных исследований, посвященных стрессу и методам его профилактики и коррекции, а пренебрежение данным методологическим приемом может приводить к неверной интерпретации результатов подобных работ (Umriukhin P.E. et al., 2012).

Наконец, в исследованиях, посвященных стресс-лимитирующим эффектам ТЭС-терапии, не изучалась экспрессия гена *c-fos* в паравентрикулярном ядре гипоталамуса (за исключением работы Лебедева В.П. и Козловски Д.П. (2005)), медиальной префронтальной коре и мононуклеарных лейкоцитах периферической крови, а внимание исследователей, прежде всего, было обращено к влиянию ТЭС-терапии на синтез гипофизарных, надпочечниковых гормонов и цитокинов (Лебедев В.П., Козловски Д.П., 2005; Апсалямова С.О., 2013; Трофименко А.И., 2014; Байкова Е.Е., 2016).

Цель исследования – изучить возможности коррекции индуцированных комбинированным стрессом нарушений экспрессии гена *c-fos* в нейронах паравентрикулярного ядра гипоталамуса, медиальной префронтальной коры и мононуклеарных лейкоцитах периферической крови крыс с различной стрессоустойчивостью с помощью ТЭС-терапии.

Задачи исследования:

1. Проанализировать динамику времени плавания до утомления и возможность разделения животных на группы в зависимости от их стрессоустойчивости.
2. Изучить возможности увеличения времени плавания до утомления у крыс с различной стрессоустойчивостью с помощью ТЭС-терапии.
3. Оценить характер экспрессии гена *c-fos*, индуцированной комбинированным стрессом, в нейронах паравентрикулярного ядра гипоталамуса у крыс со средней стрессоустойчивостью и в нейронах медиальной префронтальной коры у крыс с различной стрессоустойчивостью.
4. Оценить характер экспрессии гена *c-fos*, индуцированной комбинированным стрессом, в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови у крыс с различной стрессоустойчивостью.
5. Изучить возможности коррекции стресс-индуцированных нарушений экспрессии гена *c-fos* в нейронах паравентрикулярного ядра гипоталамуса и в нейронах префронтальной коры у крыс с определенной стрессоустойчивостью применением ТЭС-терапии.
6. Изучить возможности коррекции с помощью ТЭС-терапии стресс-индуцированных нарушений экспрессии гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови крыс с различной стрессоустойчивостью.

Научная новизна. Впервые показан стресс-лимитирующий гомеостатический характер действия ТЭС-терапии, выражающийся в улучшении временных показателей в модифицированном тесте принудительного плавания у крыс с различной стрессоустойчивостью.

Впервые показана возможность модуляции индуцированной комбинированным стрессом экспрессии гена *c-fos* в нейронах паравентрикулярного ядра крыс с определенной индивидуальной стрессоустойчивостью, за счет антистрессорного гомеостатического характера действия ТЭС-терапии.

Впервые показан характер модуляции индуцированной комбинированным стрессом экспрессии гена *c-fos* в нейронах медиальной префронтальной коры крыс с различной индивидуальной стрессоустойчивостью, обусловленный стресс-лимитирующим действием ТЭС-терапии.

Впервые показан характер модуляции индуцированной комбинированным стрессом экспрессии гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови крыс с различной индивидуальной стрессоустойчивостью, обусловленный стресс-лимитирующим действием ТЭС-терапии.

Впервые показан стресс-лимитирующий гомеостатический характер действия ТЭС-терапии, выражающийся в модуляции индуцированной комбинированным стрессом экспрессии гена *c-fos ex vivo* в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови крыс различной индивидуальной стрессоустойчивости.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Результаты настоящей работы дополняют констелляцию экспериментальных и клинических доказательств стресс-лимитирующего эффекта ТЭС-терапии данными о ее влиянии на характер копинг-стратегии крыс различной стрессоустойчивости в условиях жесткого психоэмоционального стресса в тесте принудительного плавания. Полученные результаты демонстрируют благоприятное влияние транскраниальной электростимуляции, выражающееся в модуляции экспрессии гена *c-fos* в центральных стресс-респонсивных структурах и в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови организмов с различной индивидуальной стрессоустойчивостью.

Показана значимость изучения экспрессии гена *c-fos* как патогенетического звена нейроиммуноэндокринных процессов при стрессе и как инструмента дальнейшего экспериментального и клинического исследования стресс-лимитирующего потенциала ТЭС-терапии. Результаты работы фундируют практику применения транскраниальной электростимуляции для профилактики и лечения стресс-ассоциированных заболеваний, углубляя представления о молекулярных основах гомеостатического системного эффекта данного метода.

Методология и методы исследования. Экспериментальное исследование было произведено на 180 белых нелинейных самцах крыс. В исследовании были применены современные, адекватные поставленным задачам описательный, экспериментальный, морфологический, молекулярно-биологический и статистический методы. Все животные в соответствии с поставленными задачами случайным образом были разделены на три группы: интактную (n = 10; животные не подвергались стрессу и не получали ТЭС-терапию), группу сравнения (n = 85; животные, у которых производилось моделирование комбинированного стресса, они не получали ТЭС-терапию), основную группу (n = 85; животные, у которых моделировали комбинированный стресс и которым проводили ТЭС-терапию). Животные групп сравнения и основной ранжировались в зависимости от индивидуальной

стрессоустойчивости на три подгруппы: низко-, средне- и высокоустойчивую. Моделирование комбинированного стресса осуществлялось при помощи модифицированного теста принудительного плавания и ортостатического стресса. Для ранжирования животных по стрессоустойчивости и оценки влияния ТЭС-терапии на индивидуальную стрессоустойчивость применялся модифицированный тест принудительного плавания. Для оценки экспрессии гена *c-fos* нейронами стресс-респонсивных структур мозга в условиях стресса и воздействия ТЭС-терапии был использован иммуногистохимический метод. Оценка экспрессии гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови в условиях стресса и воздействия ТЭС-терапии осуществлялась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Положения, выносимые на защиту:

1. Применение ТЭС-терапии благоприятно отражается на временных показателях крыс с различной стрессоустойчивостью в модифицированном тесте принудительного плавания, при этом данный эффект наиболее выражен у высокоустойчивых организмов.

2. Применение ТЭС-терапии предупреждает стресс-индуцированную гиперактивацию гена *c-fos* в нейронах паравентрикулярного ядра крыс со средней стрессоустойчивостью.

3. Применение ТЭС-терапии предупреждает стресс-индуцированную гиперактивацию гена *c-fos* в нейронах медиальной префронтальной коры крыс с различной индивидуальной стрессоустойчивостью.

4. Применение ТЭС-терапии предупреждает стресс-индуцированную гипоэкспрессию гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах низкоустойчивых крыс и гиперактивацию гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах среднеустойчивых и высокоустойчивых животных.

5. Применение ТЭС-терапии предупреждает индуцированное комбинированным стрессом и длительной инкубацией *ex vivo* подавление экспрессии гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах крыс с различной индивидуальной стрессоустойчивостью.

6. Изучение экспрессии гена *c-fos* как патогенетического звена нейроиммуноэндокринных изменений при стрессе можно рекомендовать в качестве инструмента дальнейшего экспериментального исследования стресс-лимитирующего потенциала ТЭС-терапии.

Степень достоверности и апробация работы. При выполнении исследования были использованы современные, информативные и адекватные поставленным задачам методы. Соискатель непосредственно участвовал в постановке экспериментов, лабораторных исследованиях, обработке результатов современными методами статистического анализа.

Основные положения работы представлялись на: XIV научно-практической конференции молодых учёных и студентов юга России «Медицинская наука и здравоохранение» (Краснодар, 2015); XV научно-практической конференции молодых учёных и студентов юга России «Медицинская наука и здравоохранение» (Краснодар, 2016); XIV международной заочной научно-

практической конференции «21 век: фундаментальная наука и технологии» (Норт-Чарлстон, 2017); Resonances science: Proceedings of articles II International scientific conference (Karlovy Vary – Moscow, 2017); XIV международной научно-практической конференция «Академическая наука – проблемы и достижения» (Норт-Чарлстон, 2017); XXIV Всемирном конгрессе по клинической медицине и иммунореабилитации (Дубай, 2018); XIV международной заочной научно-практической конференции «Фундаментальная наука и технологии – перспективные разработки» (Норт-Чарлстон, 2018).

Внедрение результатов исследования. Основные результаты исследования используются в научно-исследовательской и педагогической работе кафедры общей и клинической патологической физиологии, лаборатории молекулярно-генетических исследований кафедры биологии с курсом медицинской генетики, лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины, ЦНИЛ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (г.Краснодар) и лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (г. Сочи).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, из которых 9 – в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним.

Личный вклад автора в исследование. Диссертантом была проведена разработка дизайна исследования (80 %), проведен поиск и обзор отечественных и зарубежных источников литературы (98 %), лично выполнены лабораторные исследования, проведена статистическая обработка и анализ полученных результатов (90 %). Соискатель принимал непосредственное участие в составлении выводов и формулировании научных положений, предложений для внедрения (90 %), написании статей (85 %) и тезисов (85 %), подготовил текст и иллюстративный материал для диссертации (95 %).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 151 странице компьютерного текста, который включает 9 таблиц и 41 рисунок. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы, отражающей результаты собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, списка литературы, содержащего 268 источников, из них 53 отечественных и 215 иностранных источника, и приложений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научно-исследовательская работа выполнена на кафедре общей и клинической патологической физиологии, в лаборатории молекулярно-генетических исследований кафедры биологии с курсом медицинской генетики, лаборатории

фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (г. Краснодар) и лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (г. Сочи).

Объектами исследования являлись белые половозрелые нелинейные самцы крыс с исходной массой тела – 200–250 г в возрасте 8 недель (n = 180). Содержание животных и постановка экспериментов проводились в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016г. №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», принципами 3R, изложенными в рекомендациях ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments, 2010).

Период адаптации перед экспериментом для крыс всех групп составлял 7 дней. Животные интактной группы (n = 10) не включались в эксперимент. Забор головного мозга и крови (4 мл) методом сердечной пункции производился в первый день после адаптации (Parasuraman S., et al., 2010). Перед забором материала животные всех групп адекватно наркотизировались золетилом (Virbac, Франция) 0,8 мг на 100 г веса крысы в/м и ксиланитом 0,8 мг на 100 г веса крысы в/м (Nita-Farm, Россия) (Трофименко А.И. и др., 2014). Глубину наркоза верифицировали по угнетению роговичного рефлекса с обеих сторон и исчезновению реакции на болевые раздражители.

Для оценки выносливости, работоспособности и стрессоустойчивости остальных крыс в первый день после адаптации проводился плавательный тест, модифицированный НЦБМТ РАН (Научный центр биомедицинских технологий) (Каркищенко В.Н. и др., 2012). Ранжирование по стрессоустойчивости осуществлялась в зависимости от времени плавания до утомления. Крысы, длительность плавания которых превышала среднее время плавания или была меньше среднего времени плавания на 35 % и более, оценивались как животные с высокой и низкой стрессоустойчивостью соответственно, остальные – как среднеустойчивые (Дигурова И.И., Гущин А.Г., 2013). В каждой из данных трех выборок половина крыс получала ТЭС-терапию со 2 по 6 день ежедневно по одному сеансу в день (основная группа, n = 85), а другая – не получала (группа сравнения, n = 85). Отбор в группы производился случайно с использованием метода последовательных номеров (Festing M.F.W., Altman D.G., 2002). Таким образом, были сформированы 3 группы: интактная, сравнения и основная. Две последние включали в себя подгруппы низкоустойчивых, среднеустойчивых и высокоустойчивых животных. На 7 день модифицированный тест вынужденного плавания проводился повторно. На основании его результатов вновь оценивались выносливость, работоспособность и стрессоустойчивость животных основной группы и группы сравнения, полученные показатели сравнивались с таковыми после первого плавания. На 8 день производился ортостатический стресс: фиксация животного в специальном футляре из оргстекла (объем $0,75 \times 10^{-3}$ м^3) вниз головой под прямым углом к горизонтальной поверхности в течение 45 минут (Дигурова И.И., Гущин А.Г., 2013). Через 2 часа после ортостатического стресса производился забор материала: головного мозга и крови (4 мл) методом сердечной пункции (Parasuraman S., et al., 2010). Кровь полученная от животных всех групп разделялась на две части: из первой

центрифугированием на градиенте фиколла (ρ = 1087 кг/м^3) выделялись мононуклеарные лейкоциты, которые немедленно ресуспендировались в растворе в коммерческом растворе IntactRNA (Евроген, Россия) по инструкции производителя. Другая часть инкубировалась в течение 10 часов *ex vivo* при +4 °С, после чего осуществлялось выделение мононуклеарных лейкоцитов.

В каждой из групп экспрессия гена *c-fos* изучалась в стресс-респонсивных центрах: паравентрикулярном ядре гипоталамуса (ПВЯ) и медиальной префронтальной коре (мПФК), – иммуногистохимическим методом и в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). При этом уровень мРНК гена интереса в последнем случае оценивался через 2 часа после стресса и после инкубации *ex vivo* в течение 10 часов.

Иммуногистохимическая оценка экспрессии гена *c-fos* в ПВЯ и мПФК осуществлялась с использованием поликлональных кроличьих анти-Fos антител (1 : 100, ab209794, Abcam, Великобритания) и системы детекции Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (ab64261, Abcam, Великобритания) по рекомендациям производителя. Подсчет иммунореактивных ядер в ПВЯ производился на площади 0,075 мм^2 (0,25 мм × 0,3 мм). В каждом полушарии мПФК изучались 6 фиксированных областей площадью 0,0625 мм^2 (0,25 мм × 0,25 мм), включавших в себя поверхностные (прилежащие срединным структурам) и глубокие слои (прилежащие forceps minor corporis callosi) передней цингулярной коры (ПЦ), инфралимбической коры (ИЛ) и прелимбической коры (ПЛ). Для морфометрического анализа изображения использовалась программное обеспечение с открытым исходным кодом ImageJ 1.50i (Rasband W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, США). После перевода в 8-битовый формат и бинаризации с выставлением порога чувствительности (функция «Threshold»), производился автоматический подсчет частиц (функция «Analyze Particles»). Автоматический анализ дополнялся ручным методом. Исследователь, производивший подсчет, не имел информации о принадлежности крысы к той или иной группе.

Из полученных мононуклеарных лейкоцитов животных всех групп выделялась мРНК методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с использованием коммерческого набора ExtractRNA (Евроген, Россия) по инструкции производителя. 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 – *c-fos*, и референтного гена – *actb* – проводилось с использованием наборов TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA) c-fos:Rn02396759_m1, beta-actin: Rn00667869_m1. 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 Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия). Режим ПЦР состоял из 2 минутного прогревания смеси при 50ºС, 10-минутного прогрева при 95 °С с последующими 60 циклами: 12 сек денатурации при 95 °С, 30 сек отжига праймеров

при 56 °С и 20 сек элонгации при 72 °С. Расчет относительной экспрессии гена *c-fos* осуществлялся по Livak (методом $2^{-\Delta\Delta CT}$) (Schmittgen T.D., Livak K.J., 2008). Описание дизайна эксперимента, исследуемых образцов, протокола ПЦР-РВ производилось с учетом рекомендаций MIQE (Minimum Information or Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, 2009) (Bustin S.A. et al., 2009).

Статистическая обработка и графическое представление полученных результатов проводилась с помощью программного обеспечения Statistica версия 10.0 (StatSoft Inc., США) и GraphPad Prism версия 7.00 для Windows (GraphPad Software, Inc., США). 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 (Festing M.F.W., Altman D.G., 2002; Реброва О.Ю., 2011). Для сравнения трех независимых групп применялся критерий Краскела-Уоллиса и последующее парное сравнение групп при помощи критерия Манна-Уитни с коррекцией на множественные сравнения (Реброва О.Ю., 2002). Для выполнения задачи парных сравнений показателей двух зависимых групп использовался непараметрический Т-критерий Вилкоксона (Festing M.F.W., Altman D.G., 2002; Реброва О.Ю., 2011). Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы принимался равным 0,05 (Nuzzo R., 2014; Wasserstein R.L., Lazar N.A., 2016; Grange J.A. et al., 2018). Значения p-value были скорректированы с учетом множественности сравнений при помощи метода Бенджамини-Хохберга (FDR, false discovery rate) с использованием программного обеспечения WinPepi (Benjamini Y., Hochberg Y., 1995; Abramson J.H., 2011; Colquhoun D., 2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во втором плавательном тесте ни в одной из подгрупп группы сравнения не было выявлено положительной динамики временных показателей по сравнению с первым плавательным тестом (таблица 1). Время плавания до утомления у низкоустойчивых и среднеустойчивых животных статистически значимо не возрастало ($p = 0,2$ и $p = 0,9$ соответственно). В подгруппе высокоустойчивых животных группы сравнения имело место статистически значимое ($p = 0,04$) снижение времени плавания по сравнению с фоном на 83,6 %.

Подобные различия в динамике времени плавания могут быть объяснены кумуляцией утомления и глубоким истощением высокоустойчивых (по результатам первого плавания) крыс. Связанная с этим перестройка гемодинамических, метаболических, иммунных, нейрохимических параметров, в частности, мальадаптивное воздействие избытка катехоламинов, глюкокортикоидов и опиоидэргического дисбаланса на процесс консолидации памяти о стрессовом событии способствует формированию и закреплению пассивного поведенческого паттерна (Roozendaal B. et al., 2009; Joëls M. et al., 2011; Lee Wong D. et al., 2011Bali A. et al., 2015; William Tank A., Lee Wong D., 2015; Drexler S.M., Wolf O.T., 2017).

Таблица 1 – Динамика времени плавания до утомления животных группы сравнения, Me (Q_1–Q_3), сек

Группы / показатель	1 плавательный тест	2 плавательный тест
Низкоустойчивая подгруппа по результатам 1 плавания	172 (161–183)	181 (163–248)*
Среднеустойчивая подгруппа по результатам 1 плавания	247 (220–268)	237,5 (166–332)**
Высокоустойчивая подгруппа по результатам 1 плавания	1720 (392–5755,5)	282 (187–390,5)***

Примечание: * – отсутствие статистически значимого отличия (p = 0,2) от показателя в 1 плавательном тесте; ** – отсутствие статистически значимого отличия (p = 0,9) от показателя в 1 плавательном тесте; *** – статистически значимое (p = 0,04) отличие от показателя в 1 плавательном тесте.

Предварительное применение ТЭС-терапии благоприятно отражалось на времени второго плавания до утомления животных всех подгрупп основной группы по сравнению с первым плаванием (таблица 2). В подгруппе низкоустойчивых животных наблюдалось статистически значимое улучшение показателей во втором плавательном тесте по сравнению с фоном на 33,2 % (p = 0,01), в подгруппе среднеустойчивых крыс – на 43,6 % (p = 0,01), в высокоустойчивой подгруппе – на 447 % (p = 0,01).

Таблица 2 – Динамика времени плавания до утомления животных групп сравнения и основной, Me (Q_1–Q_3), сек

Группы / показатель	1 плавательный тест	2 плавательный тест
Низкоустойчивые по результатам 1 плавания		
Группа сравнения	172 (161–183)	181 (163–248)*
Основная группа	171 (130–191)	226 (165,5–374)**
Среднеустойчивые по результатам 1 плавания		
Группа сравнения	247 (220–268)	237,5 (166–332)***
Основная группа	258 (227–312)	370,5 (254–573)$^{\#}$
Высокоустойчивые по результатам 1 плавания		
Группа сравнения	1720 (392–5755,5)	282 (187–390,5)$^{\#\#}$
Основная группа	1093,5 (371–4735)	5987,5 (509–7716)$^{\#\#\#}$

Примечание: * – отсутствие статистически значимого отличия (p = 0,2) от показателя в 1 плавательном тесте; ** – статистически значимое (p = 0,01) отличие от показателя в 1 плавательном тесте; *** – отсутствие статистически значимого отличия (p = 0,9) от показателя в 1 плавательном тесте; $^{\#}$ – статистически значимое (p = 0,01) отличие от показателя в 1 плавательном тесте; $^{\#\#}$ – статистически значимое (p = 0,04) отличие от показателя в 1 плавательном тесте; $^{\#\#\#}$ – статистически значимое (p = 0,01) отличие от показателя в 1 плавательном тесте.

В основе данного выраженного эрготропного влияния ТЭС-терапии лежит стимуляция центральных и периферических эффектов β-эндорфина, а также модуляция серотонинергического, дофаминергического, холинергического и ГАМК-ергического механизмов (Байкова Е.Е., 2016; Занин С.А. и др., 2017). Определенную роль может играть положительное воздействие μ-опиоидергической стимуляции на процесс консолидации памяти о неблагоприятном событии (первом принудительном плавании).

В исследуемых областях ПВЯ среднеустойчивых животных группы сравнения Fos-позитивных нейронов было в 3,7 раза больше (p = 0,008), чем в интактной группе (рисунок 1), что отражало наличие и выраженность комбинированного жесткого стресса.

В исследуемых областях мозга среднеустойчивых крыс, получавших ТЭС-терапию, иммунореактивных клеток было статистически значимо (p = 0,008) меньше в 1,7 раза, чем в группе сравнения (рисунок 1). Эти данные позволяют сделать вывод о способности данного лечебного метода благоприятно воздействовать на наиболее ранний этап фенотипической перестройки секретирующих кортиколиберин нейронов, предупреждая, тем самым, дезадаптивную (особенно в контексте психоэмоционального стресса) стресс-индуцированную гиперактивацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси.

В исследуемых областях передней цингулярной коры количество иммунореактивных клеток у низкоустойчивых крыс было меньше, чем у среднеустойчивых на 46,9 % (p = 0,017) в глубоком и на 45,9 % (p = 0,04) в поверхностном слоях. В исследуемых областях передней цингулярной коры количество Fos-позитивных клеток у среднеустойчивых крыс было меньше, чем у высокоустойчивых на 5,8 % (p = 0,4) в глубоком и на 9,7 %, % (p = 0,05) в поверхностном слоях.

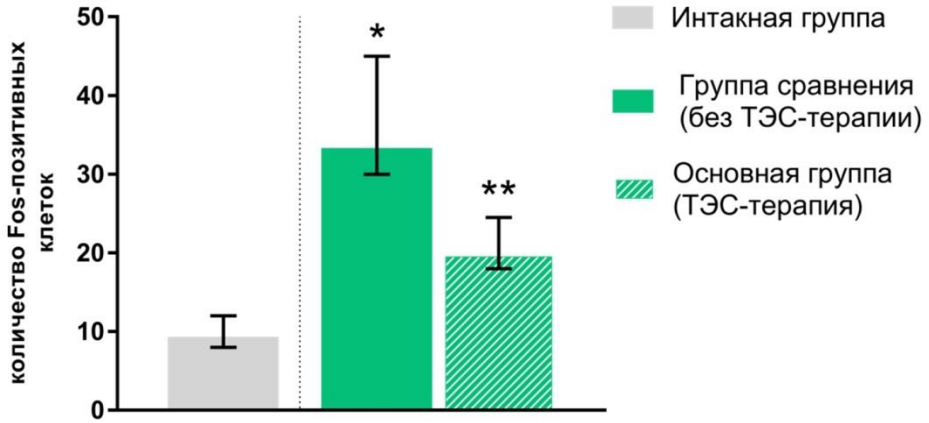

Рисунок 1 – Количество иммунореактивных клеток в исследуемых областях мозга интактных крыс и среднеустойчивых животных основной группы и группы сравнения, (Me (Q_1–Q_3)).
Примечание: * – статистически значимое (p = 0,008) различие по сравнению с интактной группой; ** – статистически значимое (p = 0,008) отличие от показателя группы сравнения

В исследуемых областях прелимбической коры количество иммунореактивных клеток у низкоустойчивых крыс было меньше, чем у среднеустойчивых на 20,6 % (p = 0,2) в глубоком и на 25,0 % (p = 0,05) в поверхностном слоях. В исследуемых областях прелимбической коры количество Fos-позитивных клеток у среднеустойчивых крыс было меньше, чем у высокоустойчивых на 37,1 % (p = 0,04) в глубоком и на 18,4 % (p = 0,5) в поверхностном слоях.

В исследуемых областях инфралимбической коры количество иммунореактивных клеток у низкоустойчивых крыс было меньше, чем у среднеустойчивых на 19,5 % (p = 0,08) в глубоком и на 19,0 % (p = 0,04) в поверхностном слоях. В исследуемых областях инфралимбической коры количество Fos-позитивных клеток

у среднеустойчивых крыс было меньше, чем у высокоустойчивых на 14,4 % (p = 0,3) в глубоком и на 5,1 % (p = 0,4) в поверхностном слоях.

Показанная в настоящей работе способность ТЭС-терапии модулировать экспрессию гена *c-fos* в префронтальной коре крыс также является проявлением стресс-лимитирующего системного действия данного лечебного метода (Трофименко А.И. и др., 2013, Тихомирова Н.Н., Артифексов С.Б., 2013; Байкова Е.Е., 2016; Сеин О.Б. и др., 2017).

В низкоустойчивой подгруппе применение ТЭС-терапии приводило к уменьшению числа иммунореактивных клеток в передней цингулярной (на 23,53 % (p = 0,4) в глубоком слое и на 50,0 % (p = 0,02) в поверхностном слое), прелимбической (на 30,43 % (p = 0,2) в глубоком слое и на 10,0 % (p = 0,2) в поверхностном слое) и инфралимбической коре (на 22,6 % (p = 0,04) в глубоком слое и на 43,33 % (p = 0,3) в поверхностном слое) относительно показателей группы сравнения (рисунок 2).

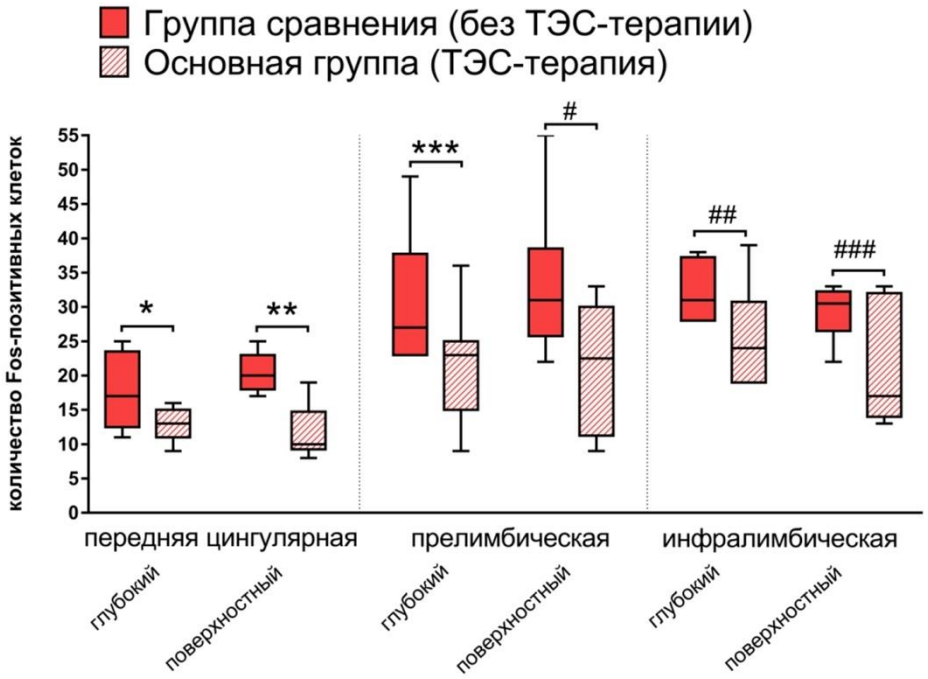

Рисунок 2 – Количество иммунореактивных клеток в исследуемых областях мПФК низкоустойчивых животных группы сравнения и основной группы (min; Q1; Me; Q3; max).
Примечание: *– p = 0,4; ** – p = 0,02; *** – p = 0,2, # – p = 0,2; ## – p = 0,04; ### – p = 0,3

Еще более выражен данный эффект был в среднеустойчивой и высокоустойчивой подгруппах. У среднеустойчивых крыс применение ТЭС-терапии приводило к снижению количества Fos-реактивных клеток в передней цингулярной (на 46,87 % (p = 0,008), в глубоком слое и на 45,95 % (p = 0,01) в поверхностном слое), прелимбической (на 47,06 % (p = 0,008) в глубоком слое и на 57,50 % (p = 0,008) в поверхностном слое) и инфралимбической коре (в глубоком слое на 64,04 % (p = 0,008) и на 59,46 % (p = 0,01) в поверхностном слое) относительно показателей в группе сравнения (рисунок 3).

В высокоустойчивой подгруппе также отмечено уменьшение числа Fos-реактивных клеток во всех исследуемых областях мПФК: передней цингулярной (на 58,82 % (p = 0,01) в глубоком слое и на 65,85 % (p = 0,008) в поверхност-

ном слое), прелимбической (на 68,52 % (p = 0,01) в глубоком слое и на 59,18 % (p = 0,015) в поверхностном слое) и инфралимбической коре (на 33,33 % (p = 0,07) в глубоком слое и на 42,31 % (p = 0,02) в поверхностном слое) относительно показателей группы сравнения (рисунок 4).

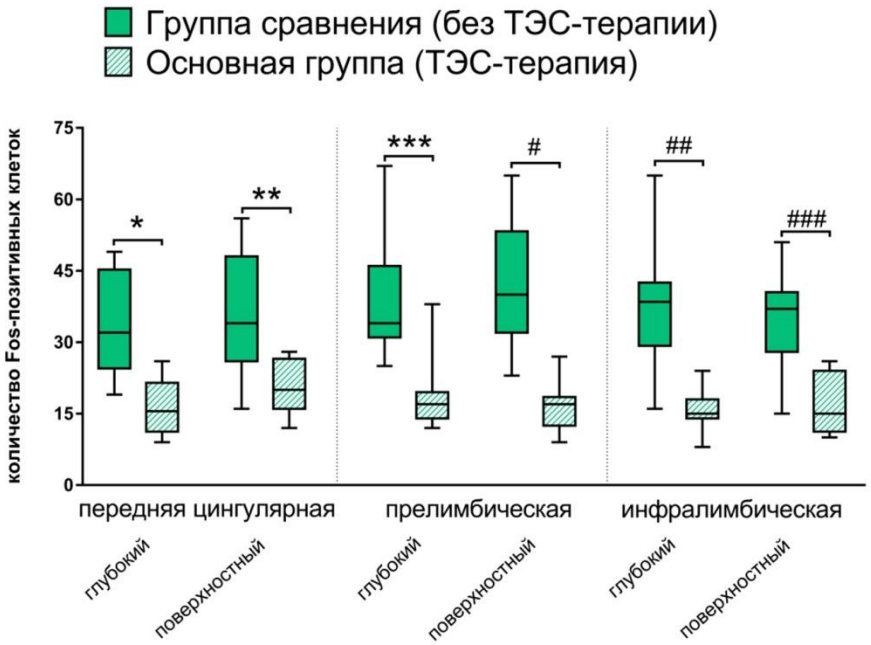

Рисунок 3 – Количество иммунореактивных клеток в исследуемых областях мПФК среднеустойчивых животных группы сравнения и основной группы (min; Q1; Me; Q3; max).
Примечание: *– p = 0,008; ** – p = 0,01; *** – p = 0,008; # – p = 0,008;
– p = 0,008; ### – p = 0,01

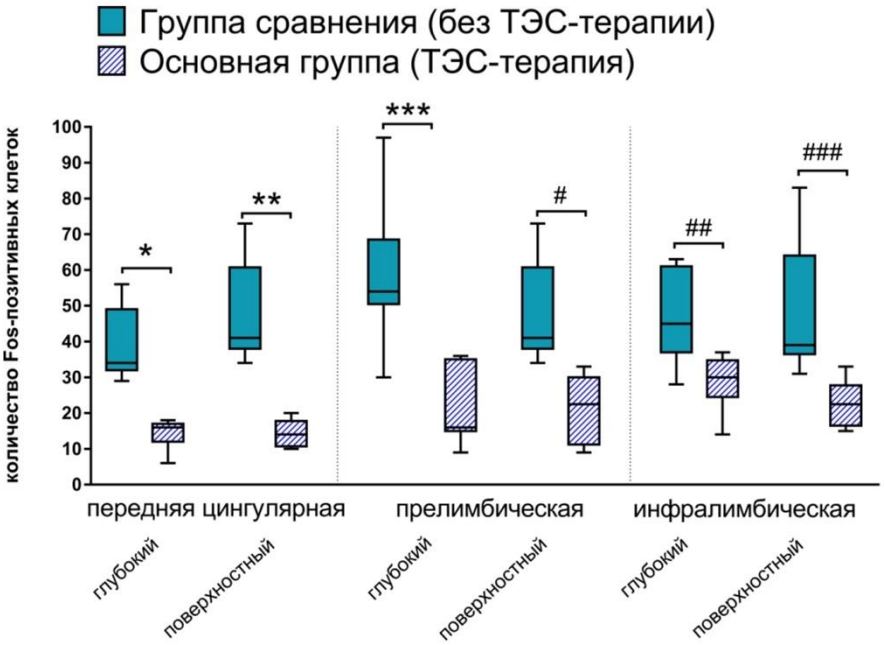

Рисунок 4 – Количество иммунореактивных клеток в исследуемых областях мПФК высокоустойчивых животных группы сравнения и основной группы (min; Q1; Me; Q3; max).
Примечание: *– p = 0,01; ** – p = 0,008; *** – p = 0,01; # – p = 0,015;
– p = 0,07; # # # – p = 0,02

Полученные результаты можно объяснить как усилением продукции β-эндорфина, так и иными, плейотропными эффектами, лежащими в основе системного гомеостатического действия ТЭС-терапии (Байкова Е.Е., 2016; Нехай Ф.М., 2016; Привалова И.Л. и др., 2016).

Таким образом, применение ТЭС-терапии предупреждало стресс-индуцированную гиперактивацию нейронов медиальной префронтальной коры крыс. Данный эффект может быть связан с гомеостатическим воздействием ТЭС-терапии на нейроиммуноэндокринную регуляцию, в том числе, на плазменный уровень гормонов стресса и цитокинов (Занин С.А. и др., 2015; Нехай Ф.А. и др., 2015; Трофименко А.И. и др., 2015; Байкова Е.Е., 2016). Катехоламины и глюкокортикоиды способны как усиливать, так и подавлять возбудимость кортикальных нейронов, взаимодействуя с низко- или высокоаффинными рецепторами (Arnsten A.F.T., 2009; Hermans E.J. et al. 2014; Myers B. et al., 2014). Вклад в проявление этого эффекта может вносить воздействие ТЭС-терапии на иные структуры мозга, приводящее к уменьшению активации пирамидных нейронов ПФК таламическими и лимбическими центрами (Лебедев В.П., Козловски Д.П., 2005). Не исключены также непосредственное влияние β-эндорфина на работу мПФК и NMDA(N-метил-D-аспартат)-рецептор-зависимые эффекты катодной стимуляции (Chang W.P. et al., 2015; Baldo B.A., 2016; de Souza A. et al., 2017).

Уровень стресс-индуцированной экспрессии гена *c-fos* в МНЛ крови животных группы сравнения отличался в трех подгруппах (рисунок 5).

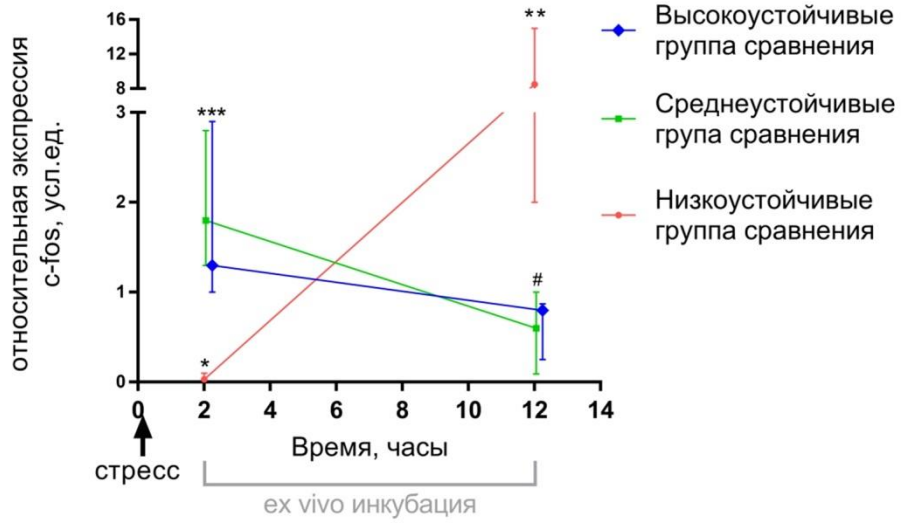

Рисунок 5 – Уровень относительной экспрессии гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах животных группы сравнения (Me (Q_1–Q_3)).
Примечание: * – статистически значимое (p = 0,01) отличие от показателя среднеустойчивой подгруппы; ** – статистически значимое (p = 0,01) отличие от показателя среднеустойчивой подгруппы; *** – отсутствие статистически значимого отличия (p = 0,6) от показателя среднеустойчивой подгруппы; # – отсутствие статистически значимого отличия (p = 0,8) от показателя среднеустойчивой подгруппы

В низкоустойчивой подгруппе имел место чрезвычайно низкий уровень данной экспрессии (0,03 (0,028–0,1)). Это может отражать характерную для низкоустойчивых организмов мальадаптивную дисфункцию ключевых стресс-реализующих систем, проявляющуюся в медиаторном обеспечении стресс-

респонсивных центров мозга, плазменном уровне гормонов стресса и цитокинов. В первую очередь, данный уровень экспрессии гена *c-fos* может быть связан с характерными для низкоустойчивых организмов чрезмерной активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, и высоким плазменным уровнем глюкокортикоидов при стрессе (Gonik M. et al., 2012; Умрюхин П.Е., Григорчук О.С., 2015; Szklarczyk K. et al., 2016).

После инкубации *ex vivo* транскрипция гена *c-fos* в низкоустойчивой подгруппе значительно увеличилась (8,5 (2–15)), что можно объяснить суммацией нескольких эффектов: собственно помещением лейкоцитов в условия *ex vivo,* низким уровнем стресс-индуцированной экспрессии гена *c-fos* и, следовательно, слабой интенсивностью реакций обратной связи, ограничивающих экспрессию гена интереса (Baechler E.C. et al., 2004; Каде А.Х. и др., 2018). В подгруппе средне- и высокоустойчивых животных имела место стресс-индуцированная гиперэкспрессия гена *c-fos* (1,8 (1,3–2,8) и 1,3 (1–2,9) соответственно), которая после инкубации *ex vivo* сменялась угнетением экспрессии (0,75 (0,35–0,8) и 0,76 (0,19–1,5) соответственно), что связано с активацией механизмов обратной связи (рисунок 5) (Каде А.Х. и др., 2018).

При применении ТЭС-терапии через 2 часа после комбинированного стресса в подгруппе низкоустойчивых животных, показано, что уровень экспрессии гена *c-fos* был сопоставим с интактным (1,0 (0,1–1,1)) и статистически значимо (p = 0,008) превышал в 33,0 раза аналогичный показатель у животных той же подгруппы группы сравнения (рисунок 6). После инкубации *ex vivo* уровень экспрессии гена *c-fos* в низкоустойчивой подгруппе основной группы возрастал еще больше (33,0 (16,85–40)) и также статистически значимо (p = 0,01) превышал в 3,9 раза аналогичный показатель группы сравнения (рисунок 6).

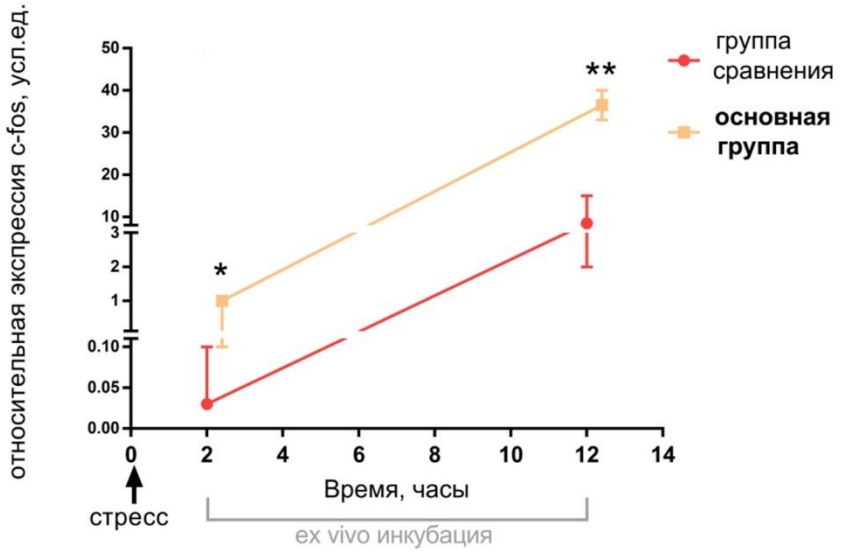

Рисунок 6 – Уровень относительной экспрессии гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах низкоустойчивых животных групп сравнения и основной (Me (Q_1–Q_3)).
Примечание: * – статистически значимое (p = 0,008) отличие от показателя группы сравнения; ** – статистически значимое (p = 0,01) отличие от показателя группы сравнения

Эти изменения могут быть связаны с указанными выше механизмами (помещение лейкоцитов в условия *ex vivo,* модуляция работы стресс-

реализующих систем ТЭС-терапией), суммирующимися с периферическими эффектами усиления продукции β-эндорфина (Байкова Е.Е., 2016).

При применении ТЭС-терапии у животных основной группы через 2 часа после стресса в среднеустойчивой подгруппе уровень экспрессии гена *c-fos* (0,6 (0,09–1)) был статистически значимо (p = 0,01) меньше в 3,0 раза, чем в группе сравнения (рисунок 7). Данное предупреждение мальадаптивной гиперактивации гена *c-fos* объясняется влиянием ТЭС-терапии на активацию основных стресс-реализующих систем и плазменный уровень гормонов стресса и цитокинов (Занин С.А. и др., 2015; Каде А.Х. и др., 2015; Нехай Ф.А. и др., 2015; Трофименко А.И. и др., 2015; Байкова Е.Е., 2016). После инкубации *ex vivo* уровень данной экспрессии в среднеустойчивой подгруппе животных основной группы не снижался, как в группе сравнения (0,75 (0,35–0,8)), а, напротив, увеличивался до сопоставимого с интактным уровня (1,4 (1,3–1,5)), что свидетельствует о меньшей выраженностью действия механизмов отрицательной обратной связи (рисунок 7).

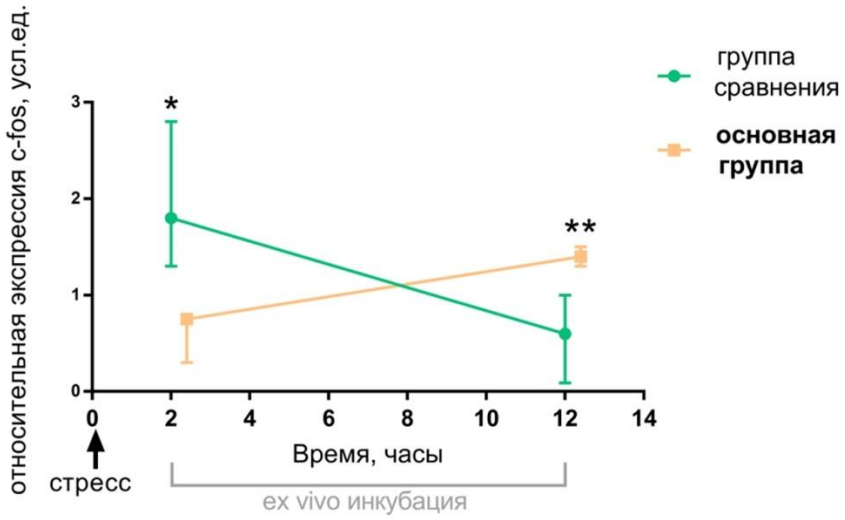

Рисунок 7 – Уровень относительной экспрессии гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах среднеустойчивых животных групп сравнения и основной (Me (Q_1–Q_3)).
Примечание: * – статистически значимое (p = 0,01) отличие от показателя группы сравнения; ** – статистически значимое (p = 0,01) отличие от показателя группы сравнения

При применении ТЭС-терапии у животных основной группы через 2 часа после стресса в высокоустойчивой подгруппе уровень экспрессии гена *c-fos* (0,15 (0,1–0,2)) также был статистически значимо (p = 0,01) меньше в 8,7 раз, чем в группе сравнения и возрастал после инкубации *ex vivo* (0,8 (0,25–0,87)) (рисунок 8). Уровень относительной экспрессии гена интереса в группах сравнения (0,76 (0,19–1,5)) и основной (0,8 (0,25–0,87)) после инкубации *ex vivo* статистически значимо не отличался (p = 0,7), однако динамика изменений в этих двух группах была различной (рисунок 8). В группе сравнения после стресса и инкубации *ex vivo* наблюдалось характерное угнетение экспрессии гена *c-fos* (рисунок 5). При применении ТЭС-терапии уровень мРНК гена интереса, напротив, возрастал со временем, что свидетельствует об изначально меньшей активации стресс-реализующих систем и, следовательно, меньшей интенсивности реакций отрицательной обратной связи (Каде А.Х. и др., 2018).

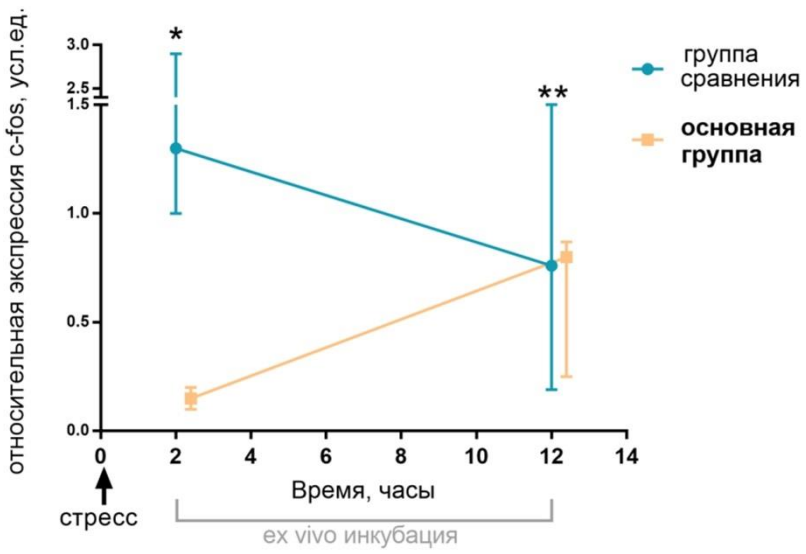

Рисунок 8 – Уровень относительной экспрессии *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах высокоустойчивых животных групп сравнения и основной (Me (Q_1–Q_3)).
Примечание: * – статистически значимое (p = 0,01) отличие от показателя группы сравнения; ** – отсутствие статистически значимого отличия (p = 0,7) от показателя группы сравнения

В основе описанного выше гомеостатического характера действия ТЭС-терапии лежит плейотропность ее эффектов. Модуляцией работы гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, симпатоадреналовой системы и функционально смежных нейроиммуноэндокринных механизмов ТЭС-терапией объясняется предупреждение стресс-индуцированной гиперактивации гена *c-fos* в среднеустойчивой и высокоустойчивой подгруппах животных. С этим же связано снижение интенсивности механизмов ограничения экспрессии гена *c-fos* по принципу обратной связи и динамика, имевшая место при инкубации мононуклеарных лейкоцитов *ex vivo*: увеличение экспрессии гена интереса во всех трех подгруппах животных основной группы. В низкоустойчивой подгруппе животных применение ТЭС-терапии повышало уровень экспрессии гена *c-fos* через 2 часа после стресса. Это может быть объяснено непосредственным эффектом β-эндорфина на экспрессию гена *c-fos*, который может быть как стимулирующим, так и ингибирующим в зависимости от контекста (Börner C., Kraus J., 2013).

Таким образом, ключевой характеристикой предварительного применения ТЭС-терапии является выраженный гомеостатический эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные экспериментальные данные углубляют и детализируют представления о стресс-лимитирующем гомеостатическом характере действия ТЭС-терапии. Применение предварительной ТЭС-терапии приводило к увеличению временных показателей в модифицированном тесте принудительного плавания у животных с различной стрессоустойчивостью. Использование предварительной ТЭС-терапии благоприятно отражалось на характере экспрессии гена *c-fos* в нейронах паравентрикулярного ядра гипоталамуса и медиальной префронтальной коры. Применение данного лечебного метода предупреждало стресс-индуцированную гиперактивацию гена *c-fos* в нейронах этих стресс-

респонсивных центров. Использование предварительной ТЭС-терапии гомеостатически воздействовало на динамику экспрессии «гена стресса» – *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови крыс. В подгруппе низкоустойчивых животных данный эффект заключался в предупреждении гипоэкспрессии гена интереса через 2 часа после стресса и стимуляции данной экспрессии в условиях *ex vivo*. В подгруппах средне- и высокоустойчивых крыс предварительная ТЭС-терапия предупреждала стресс-индуцированную (через 2 часа после стресса) гиперактивацию и последующее за этим подавление экспрессии гена *c-fos* (при инкубации *ex vivo*).

Таким образом, стресс-лимитирующее воздействие ТЭС-терапии имеет место как на уровне центральных отделов стресс-реализующих систем, отражаясь, в том числе, на наиболее ранних этапах активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, так и вне центральной нервной системы, в частности, проявляется в модуляции экспрессии лейкоцитарных генов.

ВЫВОДЫ

1. При проведении первого модифицированного теста принудительного плавания животные разделялись в соответствии со временем плавания до утомления на три подгруппы: низкоустойчивую; среднеустойчивую и высокоустойчивую. Во втором модифицированном тесте принудительного плавания по сравнению с первым тестом в группе сравнения у низкоустойчивых и среднеустойчивых животных отсутствовало статистически значимое ($p = 0,2$ и $p = 0,9$ соответственно) изменение временных показателей; у высокоустойчивых животных наблюдалось статистически значимое ($p = 0,04$) снижение времени плавания до утомления на 83,6 %.

2. В низкоустойчивой подгруппе основной группы предварительное использование ТЭС-терапии приводило к статистически значимому ($p = 0,01$) увеличению времени плавания до утомления на 33,2 %. В среднеустойчивой подгруппе основной группы – к статистически значимому ($p = 0,01$) увеличению времени плавания до утомления на 43,6 %. В высокоустойчивой подгруппе – к статистически значимому ($p = 0,01$) увеличению времени плавания до утомления на 447,6 %.

3. Количество иммунореактивных клеток в паравентрикулярном ядре гипоталамуса среднеустойчивых крыс группы сравнения после комбинированного стресса статистически значимо ($p = 0,008$) превышало в 3,7 раза таковое у животных интактной группы. В исследуемых областях медиальной префронтальной коры имела место индуцированная комбинированным стрессом гиперэкспрессия гена *c-fos*. Количество иммунореактивных клеток в низкоустойчивой подгруппе было меньше такового в среднеустойчивой подгруппе группы сравнения как в глубоком, так и поверхностном слоях передней цингулярной, прелимбической и инфралимбической коры. Количество иммунореактивных клеток в среднеустойчивой подгруппе было меньше такового в высокоустойчивой подгруппе группы сравнения как в глубоком, так и поверхностном слоях передней цингулярной, прелимбической и инфралимбической коры.

4. В мононуклеарных лейкоцитах периферической крови низкоустойчивых животных группы сравнения через 2 часа после комбинированного стресса уровень относительной экспрессии гена *c-fos* был статистически значимо (p = 0,01) меньше в 60 раз, чем в среднеустойчивой подгруппе. Уровень экспрессии гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах высокоустойчивых животных группы сравнения статистически значимо не отличался (p = 0,6) от показателя среднеустойчивой подгруппы.

5. При применении предварительной ТЭС-терапии количество иммунореактивных клеток в паравентрикулярном ядре гипоталамуса среднеустойчивых крыс основной группы было статистически значимо (p = 0,008) меньше на 42,4 %, чем в группе сравнения. Количество иммунореактивных клеток в исследуемых областях медиальной префронтальной коры во всех подгруппах основой группы было меньше такового в аналогичных подгруппах группы сравнения как в глубоком, так и поверхностном слоях передней цингулярной, прелимбической и инфралимбической коры.

6. Предварительное применение ТЭС-терапии предупреждало стресс-индуцированную гипоэкспрессию гена *c-fos* у низкоустойчивых и гиперэкспрессию гена *c-fos* у средне- и высокоустойчивых животных. Уровень относительной экспрессии гена *c-fos* 2 часа после стресса в мононуклеарных лейкоцитах низкоустойчивых крыс при предварительном применении ТЭС-терапии был в 33 раза больше (p = 0,008), чем в группе сравнения. Уровень данной экспрессии при предварительном применении ТЭС-терапии был в 3 раза меньше (p = 0,01), чем в группе сравнения у среднеустойчивых крыс и в 8,7 раза меньше (p = 0,01) у высокоустойчивых крыс.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Оценку экспрессии гена *c-fos* в нейронах паравентрикулярного ядра гипоталамуса и медиальной префронтальной коры крыс целесообразно использовать для изучения механизмов гомеостатического стресс-лимитирующего действия ТЭС-терапии.

2. Изучение экспрессии гена *c-fos* в мононуклеарных лейкоцитах *ex vivo* можно рекомендовать в качестве экспериментального метода оценки функциональных возможностей лейкоцитов в неблагоприятных условиях.

3. Рекомендовать дальнейшее изучение профиля экспрессии лейкоцитарных генов, в частности генов стресса, которое позволит углубить и детализировать представления о благоприятном гомеостатическом эффекте ТЭС-терапии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Выявленная возможность коррекции ТЭС-терапией стресс-индуцированных нарушений активации гена *c-fos* в нейронах стресс-респонсивных структур и мононуклеарных лейкоцитах крови крыс с различной стрессоустойчивостью обосновывает необходимость дальнейшего углубленного изучения молекулярных механизмов стресс-лимитирующего потенциала данного лечебного метода (Peng R., 2015; Baker M., 2016).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*1. **Модификация методики ТЭС-терапии для ее применения у мелких лабораторных грызунов / А.С. Липатова, П.П. Поляков, А.Х. Каде [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – URL : https://science-education.ru/ru/article/view?id = 22696 (дата обращения: 12.03.2018).**

2. Липатова, А.С. Методика наложения электродов при транскраниальной электростимуляции в модификации для мелких лабораторных животных / А.С. Липатова, **П.П. Поляков**, А.Х. Каде // «Медицинская наука и здравоохранение»: материалы XIV научно-практической конференции молодых учёных и студентов Юга России. – Краснодар, 2016. – С. 23–25.

*3. **Роль каскадов митоген активируемых протеинкиназ в индукции экспрессии генов c-fos и c-jun / П.П. Поляков, А.С. Липатова, А.Х. Каде [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – Т. 19. – № 11 – С. 37–43.**

*4. **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. 4–11.**

*5. **Влияние ТЭС-терапии на характер стресс-индуцированной экспрессии c-fos нейронами паравентрикулярного ядра гипоталамуса / П.П. Поляков, А.С. Липатова, А.С. Сотниченко [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2017. – № 5. – С. 121–126.**

*6. **Характер экспрессии c-fos нейронами медиальной префронтальной коры в условиях комбинированного стресса и влияния ТЭС-терапии / А.Х. Каде, П.П. Поляков, А.С. Липатова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 5. – URL : https://science-education.ru/ru/article/view?id = 26877 (дата обращения: 12.03.2018).**

*7. **Коррекция ТЭС-терапией стресс-индуцированных нарушений экспрессии c-fos мононуклеарными лейкоцитами крыс/ П.П. Поляков, А.А. Агумава, Л.Р. Гусарук [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2017. – Т. 24. – № 6. – С. 106–109.**

8. Влияние ТЭС-терапии на характер стресс-индуцированной экспрессии c-fos нейронами медиальной префронтальной коры / А.Х. Каде, **П.П. Поляков**, А.С. Липатова [и др.] // Resonances science proceedings of articles II international scientific conference. – Karlovy Vary-Moscow, 2017. – С. 154–158.

9. Возможности коррекции нарушений стресс-индуцированной экспрессии c-fos нейронами паравентрикулярного ядра гипоталамуса ТЭС-терапией / А.Х. Каде, **П.П. Поляков**, А.С. Липатова [и др.] // «Актуальные направления фундаментальных и прикладных исследований»: материалы XIII международной научно-практической конференции: в 2-х томах. – Норт-Чарлстон, 2017. – С. 66–68.

10. Возможность коррекции стресс-индуцированных нарушений экспрессии гена c-fos мононуклеарными лейкоцитами как характеристика гомеостати-

ческого эффекта ТЭС-терапии / А.Х. Каде, **П.П. Поляков**, А.А. Агумава [и др.] // «Академическая наука – проблемы и достижения»: материалы XIV международной научно-практической конференции. – Норт-Чарлстон, 2017. – С. 23–26.

*11. **Экспрессия c-fos как маркер стресс-индуцированных нейроиммуноэндокринных нарушений и возможности ее коррекции ТЭС-терапией / П.П. Поляков, А.А. Агумава, А.С. Сотниченко [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2017. – Т. 18. – № 4. – С. 237–238.**

*12. **Влияние ТЭС-терапии на характер стресс-индуцированной экспрессии гена c-fos мононуклеарными лейкоцитами крыс различной стрессоустойчивости / А.Х. Каде, П.П. Поляков, А.А. Агумава [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 1. URL : http://www.science-education.ru/ru/article/view?id = 27389 (дата обращения: 12.03.2018).**

13. Коррекция стресс-индуцированной ex vivo экспрессии гена c-fos в мононуклеарных лейкоцитах крыс ТЭС-терапией / А.Х. Каде, **П.П. Поляков**, А.А. Агумава [и др.] // «Фундаментальная наука и технологии – перспективные разработки»: материалы XIV международной научно-практической конференции. – Норт-Чарлстон, 2018. – С. 15–19.

*14. **Влияние транскраниальной электростимуляции на выносливость крыс с разной устойчивостью к стрессу / А.С. Липатова, П.П. Поляков, А.Х. Каде [и др.] // Биомедицина. – 2018. – № 1. – С. 84–91.**

*** – работа опубликована в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

мПФК – медиальная префронтальная кора
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
НЦБМТ – Научный центр биомедицинских технологий
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
ТЭС – транскраниальная электростимуляция
ЦНИЛ – центральная научно-исследовательская лаборатория