

УДК 616.092.9: 599.323.4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГИППОКАМПА НА РАННЕМ СРОКЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО СТРЕССОВОГО РАССТРОЙСТВА У КРЫС

Сидорова М.В., Ваколюк И.А.

Институт живых систем (ИЖС), Балтийский Федеральный Университет им. Иммануила Канта, Калининград, e-mail: sidorova.mari@list.ru

Цель исследования состояла в моделировании посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) у нелинейных крыс дикого типа и выяснении возможных структурных изменений в области гиппокампа на раннем сроке после формирования состояния тревожного расстройства. Для формирования у крыс симптомов, аналогичных при ПТСР, применяли модель «стресс-рестресс» с внесением модификации (дополнительный триггер в рестрессе). Результаты поведенческого фенотипирования показали, что наиболее значительным был критерий «время пребывания» для открытых и закрытых рукавов лабиринта, а также в центральной области. Морфометрическое измерение объемов как правого, так и левого гиппокампа показало отсутствие статистически значимых различий между контрольной и экспериментальной группами. Полученные результаты предполагают, что данная модель ПТСР требует большего времени для формирования видимых структурных изменений в мозге.

Ключевые слова: посттравматическое стрессовое расстройство, модель «стресс-рестресс», поведенческое фенотипирование, гиппокамп

DETERMINATION OF STRUCTURAL CHANGES OF THE HIPPOCAMPUS IN THE EARLY PERIOD OF MODELING PTSD IN RATS

Sidorova M.V., Vakoliuk I.A.

Institute of life science (ILS), Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, e-mail: sidorova.mari@list.ru

The purpose of the study was to modeling post-traumatic stress disorder (PTSD) in nonlinear wild-type rats and determines possible structural changes in the hippocampal region in the early period after the formation of the state of the anxiety disorder. We had used the model «stress-restress» with the addition of the modification (added trigger in restresse) for the formation in rats of symptoms similar to PTSD. Results of behavioral phenotyping showed that the most significant criterion was of «time spent» in the open and closed arms of the maze and in the central region. Morphometric measurement of volume, the right and left hippocampus showed no statistically significant differences between the control and experimental groups. The results suggest that this model of PTSD requires more time to form visible structural changes in the brain.

Keywords: post-traumatic stress disorder (PTSD), model single prolonged stress (stress-restress), behavioral phenotyping, hippocampus

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) является единственным серьезным психическим расстройством, имеющим определенное этиологическое происхождение – травматическое событие, которое предполагает опасное для жизни воздействие, угрозу физической целостности себя и окружающих, и вызывает состояние сильного страха, беспомощности или ужаса [5, 6]. Люди, у которых развилось ПТСР вследствие психотравмирующих ситуаций, таких как военные действия, сексуальное или физическое насилие, стихийные бедствия, транспортные аварии, испытывают хронический психологический стресс, что может приводить к формированию поведенческих и психических отклонений [1, 4]. Постоянное переживание своих травм через навязчивые, возвращающиеся воспоминания, избегания мест и людей, напоминающих травмирующее событие, не-

рвозность и ночные кошмары существенно мешают повседневной жизни и способствуют развитию коморбидных состояний [10].

К настоящему времени механизмы развития ПТСР остаются неясными. Собрано большое количество данных нейровизуализации и клинических исследований о конкретных структурных и функциональных изменениях в мозге пациентов и животных с ПТСР. Среди обнаруженных нарушений отмечают гиперактивацию миндалины, сокращение объема областей префронтальной коры и гиппокампа [5, 6]. При этом самыми повторяющимися нарушениями, коррелирующими с развитием ПТСР, являются патологическая морфология и снижение объема гиппокампа, а также повышение нейронального апоптоза в данной области [4, 5]. С другой точки зрения, уменьшение объема гиппокампа больше связано с самим травмирующим воздействием, чем

с наличием или интенсивностью ПТСР [8]. Таким образом, несмотря на проведенные ранее исследования, вопрос о том, является ли структурное изменение объема гиппокампа биомаркером наличия ПТСР или предрасположенностью к его развитию, остается открытым [6, 10].

Экспериментально применять в исследованиях на людях стресс-факторы, способные вызвать ПТСР, этически недопустимо, поэтому при изучении механизмов развития данной патологии широко используют животные модели [2, 4]. Существуют различные животные модели формирования ПТСР, которые предполагают воздействие травматического стресса на животных с последующим исследованием системных и молекулярных механизмов влияния стресса на центральную нервную систему. Сроки изучения развития отклонений и изменений после индуцирования тревожного расстройства могут быть различными в зависимости от исследуемой структуры мозга (от получаса до нескольких месяцев). В целом, применение животных моделей тесно связано с проблемой адекватного моделирования тревожного расстройства на разных линиях крыс и воспроизводимостью результатов поведенческого фенотипирования [2, 7].

Цель данного исследования состояла в моделировании ПТСР у нелинейных крыс дикого типа и выявлении возможных структурных изменений в области гиппокампа на раннем сроке (10 дней) после формирования состояния тревожного расстройства.

Материалы и методы исследования

Объект исследования

Для изучения структурных изменений гиппокампа в поведенческой модели ПТСР были сформированы контрольная и экспериментальная группы животных, по семь особей в каждой (нелинейные крысы, самцы; масса тела 180–200 г, возраст – 1,5–2 месяца). Животных содержали в стандартных клетках по две крысы в каждой, при свободном доступе к пище и воде, световом режиме 12C:12T и температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$.

Моделирование посттравматического стрессового расстройства

Для формирования у крыс симптомов, аналогичных при ПТСР, применяли модель «стресс-ресстресс» [1, 9] с внесением модификации. Модель включала два этапа: тяжелый травматический стресс (иммобилизация, вынужденное плавание, воздействие паров эфира до потери сознания) и через семь суток – напоминающий рестресс. Применяли следующий алгоритм формирования травматического стресса: иммобилизация животного в рестрейнере в течение 2 часов, вынужденное плавание в пластиковом цилиндре диаметром 20 см и высотой 50 см, заполненном водой на 1/3 (температура воды 25°C) в течение 20 минут, 15 минут отдыха и просушивания в пустой клетке, затем помещение в камеру с эфиром

до потери сознания. Через семь суток проводили рестресс, который включал последовательно 30-минутную иммобилизацию с добавлением воздействия эфиром как триггера, усиливающего развитие тревожного патологического состояния.

Поведенческое фенотипирование

Поведенческое фенотипирование проводили в приподнятом крестообразном лабиринте до начала формирования тревожного расстройства и на 7-й день после стресса перед проведением рестресса, контрольную группу оценивали один раз. Лабиринт располагался над полом на высоте (60 см) и состоял из двух закрытых (50×14 см) и двух открытых (50×14 см) рукавов с открытым верхом, а также центральной области на пересечении рукавов. Крысу помещали в центральную область головой по направлению к открытому рукаву и оставляли в лабиринте на 5 мин. Поведение животного в лабиринте регистрировали на видеокамеру (GoPro, частота дискретизации 50 кадров/сек), затем видеозапись обрабатывали при помощи программы Real Timer. Регистрировали основные поведенческие характеристики, такие как время пребывания в открытых и закрытых рукавах лабиринта, в центральной области, количество заходов в открытые и закрытые рукава, количество стоек без опоры и с опорой на стенки лабиринта, груминг и замирание. Вход в рукав засчитывался по задним лапам животного, когда оно пересекало границу между центром и рукавом всем телом. После проведения теста лабиринт дезинфицировали этанолом и оставляли на 15 минут.

Измерение объема гиппокампа

После декапитации животных образцы мозгов крыс были выделены через 10 дней после воздействия травмирующего стресса и зафиксированы для приготовления гистологических срезов в 4% параформальдегиде. Перед приготовлением срезов за 24 ч до замораживания ткани мозга крысы материал помещали в 30% раствор сахарозы. Срезы толщиной 50 мк готовили на криостате (Leica 1850, Germany) и окрашивали в соответствии с протоколом по авидин-биотиновой методике, располагали по предметным стеклам и заключали в NewMount. Сканирование образцов выполняли на микроскопе (KEYENCE BZ-9000, Japan). Обработку полученных изображений фронтальных срезов, выделение и измерение площади области гиппокампа производили в программе ImageJ, ориентируясь на атлас (Rat Brain – Paxinos G. and Watson C.), вычисление объема проводили в Microsoft Excel 2010. Результаты представлены с использованием стандартной ошибки среднего, достоверность различий оценивали по критерию Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты поведенческого фенотипирования экспериментальной группы крыс до и после индуцирования ПТСР по сравнению с контролем показали, что из всех рассматриваемых поведенческих характеристик наиболее показательным был критерий «время пребывания» для открытых и закрытых рукавов лабиринта, а также в центральной области. И в кон-

трольной группе, и в экспериментальной до формирования ПТСР время, проведенное в указанных зонах крестообразного лабиринта, не различалось, что указывает на поведенческую однородность групп. После индуцирования ПТСР время нахождения в открытых рукавах и центральной области снижается, в то время как в закрытых рукавах возрастает. Различия значимы с применением стандартной ошибки среднего. Однако при использовании критерия Манна-Уитни, статистическая значимость различий не подтвердилась (рис. 1, «контроль-ПТСР», закрытые рукава, $p = 0,14$). Полученные нами результаты диссонируют с данными ряда исследований, в которых показано увеличение времени пребывания стрессированных крыс в центральной области, что, по мнению авторов, свидетельствует о трудностях крыс в выборе действия [2]. Такое несоответствие может иметь под собой несколько причин. Прежде всего, в исследованиях широко используют крыс линии Wistar, которые отличаются по поведению от нелинейных крыс, используемых нами: последние, возможно, обладают более мощным адаптивным потенциалом по отношению к стрессовым факторам. Кроме того, мы полагаем, что такие результаты могли быть получены из-за сокращения времени, введенного нами на формирование ПТСР у животных, по сравнению со стандартными методиками, которые предполагают

3 недели, поскольку мы преследовали цель выяснить, насколько рано можно заметить различия в поведении у стрессированных нелинейных крыс.

Стоит отметить, что количество заходов в рукава у крыс экспериментальной группы по сравнению с контролем значимо не изменилось, несмотря на имеющиеся различия между ними в закрытых рукавах (рис. 2, критерий Манна-Уитни, $p = 0,64$). Результаты показывают, что через 10 дней после травматического воздействия животные не снижают своей локомоторной активности в лабиринте, но эти данные соотносятся с исследованием [3], в котором общее количество заходов у крыс с ПТСР даже несколько выше, чем в контроле.

Проведенное нами морфометрическое измерение объемов, как правого, так и левого гиппокампа показало отсутствие статистически значимых различий между контрольной и экспериментальной группами, несмотря на видимые различия при использовании параметрического анализа (рис. 3, критерий Манна-Уитни $p > 0,99$ – для левого гиппокампа, $p = 0,07$ – для правого гиппокампа). Это позволяет предположить, что либо за такой короткий промежуток времени никаких изменений в объеме гиппокампа происходить не должно, либо нелинейные крысы дикого типа, которых мы использовали в эксперименте, более устойчивы к стрессорным воздействиям, и данная модель неэффективна по отношению к ним.

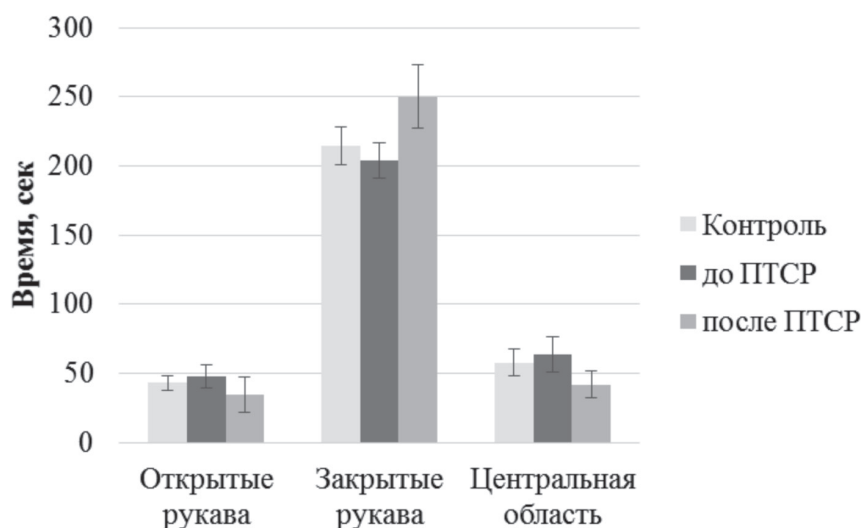


Рис. 1. Время нахождения крыс в различных частях лабиринта ($\text{mean} \pm \text{SEM}$). По горизонтальной оси указаны области крестообразного лабиринта, по вертикальной оси отмечено время нахождения животных в соответствующих областях. Легенда: «Контроль» – контрольная группа, «до ПТСР» – экспериментальная группа до формирования ПТСР, «после ПТСР» – экспериментальная группа после формирования ПТСР

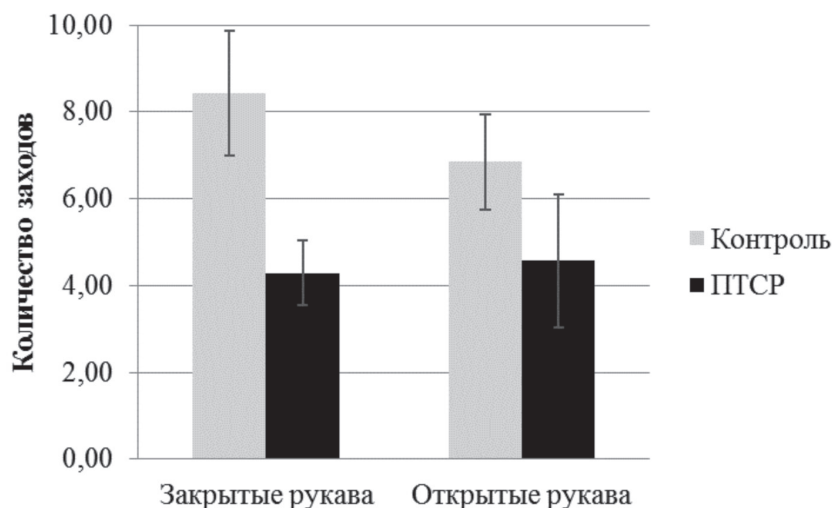


Рис. 2. Общая активность (количество заходов в рукава) крыс в лабиринте ($\text{mean} \pm \text{SEM}$). Легенда: «Контроль» – контрольная группа, «ПТСР» – экспериментальная группа после формирования ПТСР

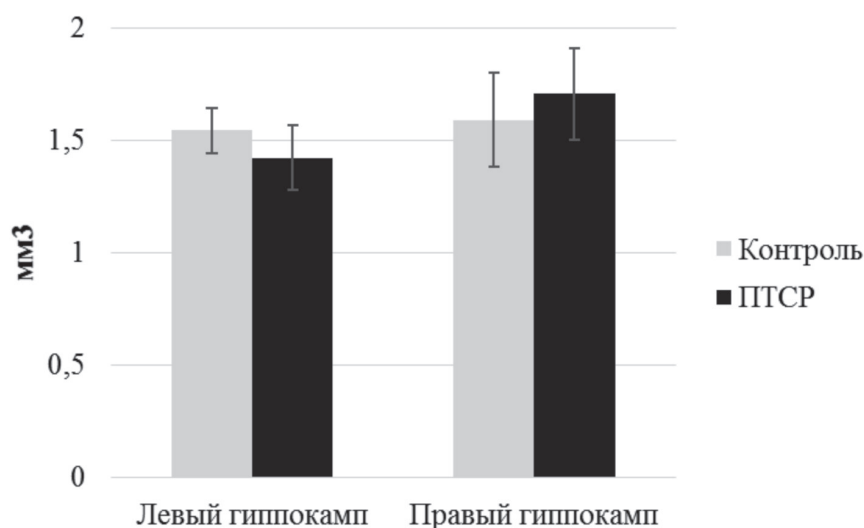


Рис. 3. Измерение объема гиппокампа ($\text{mean} \pm \text{SEM}$). По вертикальной оси указан объем гиппокампа в правой и левой половине мозга (в мм^3). Легенда: «Контроль» – контрольная группа, «ПТСР» – экспериментальная группа после формирования ПТСР

Закключение

Гиппокамп – одна из основных структур головного мозга, обеспечивающих реализацию механизмов памяти, поведенческих реакций, в том числе избегания стрессовых воздействий. Уменьшение объема гиппокампа отмечено в большом количестве работ, посвященных исследованию изменений структур мозга при ПТСР, которые выполнены с применением метода фМРТ [6, 7]. Полученные в нашем исследовании изменения в объеме гиппокампа не являются

статистически значимыми, что, в сочетании с отсутствием достоверных изменений поведенческих характеристик и уровня тревожности у животных экспериментальной группы по сравнению с контролем, ставит под сомнение формирование ПТСР за короткий промежуток времени у нелинейных крыс. Уместно отметить, что модель «стресс-рестресс» была применена нами на крысах, имеющих значительно менее однородный генотип по сравнению с линейными лабораторными крысами, и, как следствие, усложнение протокола моделирования тре-

возможного расстройства. Однако отмеченные различия в поведении экспериментальной группы до и после стрессирования позволяют предполагать успешность данной поведенческой модели при использовании крыс Wistar и увеличении временного периода после травматического воздействия [1–3].

Список литературы

1. Баранова К.А. Экспрессия транскрипционных факторов в мозге крыс при формировании тревожно-депрессивных состояний и реализации антидепрессивных эффектов гипоксического preconditionирования: дис. ... кандидата биологических наук: 03.03.01 / Баранова Ксения Александровна. – Санкт-Петербург, 2013. – 23 с.
2. Безнин Г.В. Структурно-функциональные основы нарушений поведения на модели посттравматического стрессового расстройства у крыс: дис. ... кандидата медицинских наук: 03.03.01, 03.03.04 / Безнин Глеб Владимирович. – Санкт-Петербург, 2014. – 164 с.
3. Ebenezer P.J., Wilson C.B., Wilson L.D. et al. The anti-inflammatory effects of blueberries in an animal model of post-traumatic stress disorder (PTSD) // PLoS ONE, 2016, vol. 11(9). – P. 1–17.
4. Karl A., Schaefer M., Malta L.S. et al. A meta-analysis of structural brain abnormalities in PTSD // Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2006, vol. 30 (7). – P. 1004–1031.
5. Pitman R.K., Rasmusson A.M., Koenen K.C. et al. Biological Studies of Posttraumatic Stress Disorder // Nature Reviews Neuroscience, 2012, vol. 13(11). – P. 769–787.
6. Schmidt U., Kaltwasser S.F., Wotjak C.T. Biomarkers in Posttraumatic Stress Disorder: Overview and Implications for Future Research // Disease Markers, 2013, vol. 35 (1). – P. 43–54.
7. Whitaker A.M., Gilpin N.W., Edwards S. Animal models of post-traumatic stress disorder and recent neurobiological insights // Behavioural pharmacology, 2014, vol. 25. – P. 398–409.
8. Woon F.L., Sood S., Hedges D.W. Hippocampal volume deficits associated with exposure to psychological trauma and posttraumatic stress disorder in adults: a meta-analysis // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2010, vol. 34 (7). – P. 1181–1188.
9. Yamamoto S., Morinobu S., Takei S et al. Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder // Depression and Anxiety, 2009, vol. 26. – P. 1110–1117.
10. Zoladz P.R., Park C.R., Fleshner M. et al. Psychosocial predator-based animal model of PTSD produces physiological and behavioral sequelae and a traumatic memory four months following stress onset // Physiology and Behavior, 2015, vol. 147. – P. 183–192.