

<https://doi.org/10.17116/jnevro201811810148>

Модификация глутаматергических механизмов в модели постстрессового расстройства

А.А. МОКРУШИН

ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, Санкт-Петербург, Россия

Цель исследования. Изучение вклада NMDA-зависимых механизмов в развитие посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) путем исследования эффектов, индуцируемых аппликацией агониста NMDA-рецептора на переживающие срезы мозга активных и пассивных крыс, подвергнутых неизбежному водно-иммерсионному воздействию. **Материал и методы.** Крысы линии Вистар были распределены на две группы в поведенческих опытах по признаку активной и пассивной стратегии поведения. Их подвергли неизбежному водно-иммерсионному воздействию, а затем спустя 10 дней из их мозга были приготовлены переживающие срезы обонятельной коры. На срезах проводилась регистрация и анализировалась динамика NMDA-зависимых механизмов на аппликацию агониста NMDA-рецептора в концентрации 50 мкМ. **Результаты и заключение.** Были выявлены различные изменения амплитуд NMDA-стимулируемых постсинаптических ответов в срезах мозга крыс с активной и пассивной стратегиями поведения при формировании ПТСР. NMDA-стимулируемые ответы в мозге крыс с активной стратегией поведения были более устойчивыми к действию стресса. Их амплитуда снижалась, но не блокировалась. У крыс с пассивной стратегией поведения NMDA-зависимые механизмы были более уязвимыми, что проявлялось в выраженном угнетении их активности.

Ключевые слова: активное поведение, пассивное поведение, крысы, срезы мозга, постстрессовые расстройства.

Modification of glutamatergic mechanisms in the model of posttraumatic stress disorder

A.A. MOKRUSHIN

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

Objective. To study the involvement of NMDA-dependent mechanisms in the development of posttraumatic stress disorder (PTSD) by investigation of the effects induced by NMDA application in olfactory cortex slices of active and passive rats exposed to inescapable water-immersion stress. **Material and methods.** Wistar rats were selected in behavioral experiments according to their active or passive behavior. Rats were subjected to unavoidable water-immersion stress, and then after 10 days the surviving brain slices (olfactory cortex) were prepared. NMDA-dependent responses were recorded and analyzed after 50 μ M NMDA applications on the slices. **Results and conclusion.** Different changes in NMDA-stimulated amplitudes were detected in brain slices of rats depending on their passive or active behavior during the formation of PTSD. NMDA responses in the brains of rats with active behavioral strategy were more resistant to stress. Their activity was inhibited, but not blocked. In rats with passive behavior strategies, NMDA-dependent mechanisms were more vulnerable that was manifested as prominent depression of their activity.

Keywords: active behavior, passive behavior, rats, brain slices, post traumatic stress disorder.

Важной и практически значимой задачей современной фундаментальной медицины является исследование механизмов дезадаптации, приводящей к патологическим изменениям в нервной системе. Известно, что интенсивный и длительный стресс приводит к формированию патологических состояний и развитию постстрессовых расстройств (в клинической психиатрии они обозначаются термином «посттравматическое стрессовое расстройство», ПТСР) [1]. Речь идет о комплексе возникающих в результате стрессорных событий разной силы неврологических и психических нарушений, которые иногда могут представлять угрозу жизни [2]. Особенностью ПТСР является его развитие в отсроченный период после стресса. Латентный период может составлять от нескольких недель до 6 мес. В некоторых случаях (в зависимости от интенсивности стресса и функционального

состояния организма) течение постстрессового расстройства становится хроническим и возможен его переход в устойчивое изменение поведения. С симптомами ПТСР тесно связаны тревожность и депрессия.

В.Г. Шаляпиной и соавт. [3] для изучения постстрессовых нарушений были разработаны модели на животных на основе стратегии их приспособительного поведения [3–5]. Для этой цели использовались две группы крыс линии Вистар — активные и пассивные. У крыс с активной поведенческой стратегией с высокой психомоторной реактивностью и низкой тревожностью после неизбежных авersive воздействий быстро возникает поведенческая депрессия, но со временем она исчезает; у пассивных животных с низкой психомоторной реактивностью и высокой тревожностью развивается отсроченная патология, ко-

торая сразу приобретает характер длительной поведенческой депрессии.

Исследование этих моделей показало, что в развитие ПТСР вовлечены глутаматергические и ГАМКергические механизмы, а также N-methyl-D-aspartic (NMDA)-рецепторы [6–9]. Отметим, что функционирование NMDA-рецепторов принципиально для передачи, обработки сигналов и формирования адаптивного поведения, как в норме, так и при патологических состояниях.

Цель настоящего исследования — изучение вклада NMDA-зависимых механизмов в развитие ПТСР в экспериментах с аппликацией NMDA на переживающие срезы обонятельной коры крыс с активной и пассивной формами поведения, подвергнутых неизбежному водно-иммерсионному воздействию.

Материал и методы

Работа выполнялась на животных из биокolleкции «Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Эксперименты были проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными European Communities Council Directive.

Методом поведенческого тестирования в Т-образном лабиринте животных разделяли на активную и пассивную группы на основе стратегии приспособительного поведения. Показателем было время, проведенное крысой в активном либо в неподвижном состоянии. Оно рассчитывалось в статистико-вероятностной модели и выражалось индексами поведенческой активности и пассивности, а также средней скоростью движения [4, 10]. Аверсивную неизбежную ситуацию создавали путем водно-иммерсионного воздействия [4]. Фиксированных в железных пеналах крыс, укрепленных на общей платформе, погружали в холодную (+16 °C) воду на 1 ч в положении на спине, затем обсушивали и переносили в обычные клетки.

Опыты были проведены на 9 крысах-самцах линии Вистар: 4 крысы с активной и 5 крыс с пассивной формами поведения.

Через 10 дней после стресса крыс декапитировали, и из их мозга готовили переживающие срезы обонятельной коры, в которых регистрировалась биоэлектрическая активность. Анализировали амплитуду возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП). Они опосредованы глутаматергическими ионотропными NMDA-рецепторами и генерируются в нейронах в ответ на раздражение латерального обонятельного тракта (ЛОТ) — основного афферентного входа [5]. Оценку изменения амплитуд NMDA-стимулируемых ответов в срезах производили по каждой группе крыс отдельно.

Были исследованы эффекты, наблюдаемые при аппликации агониста NMDA-рецепторов (N-methyl-D-aspartic acid, «Sigma»), растворенном в инкубационном растворе в концентрации 50 мкМ на срезы обонятельной коры мозга крыс с активной и пассивной стратегиями поведения. Данная концентрация выбрана эмпирически как наиболее эффективная при воздействии на NMDA-рецепторы.

Дизайн экспериментов был следующим: в течение 15 мин регистрировали NMDA-зависимые ВПСП в срезах без воздействия агониста, затем апплицировали раствор с

NMDA в течение 61 мин. Через 1 мин по завершении воздействия агониста производили тест на изменения нейропластических свойств долговременной посттетанической потенциации (ДПП) и долговременной посттетанической депрессии (ДПД) нейронов срезов. Он заключался в электрической тетанизации ЛОТ с частотой 100 Гц в течение 15 с. После завершения тетанизации регистрировали амплитуды NMDA-индуцируемых ответов на одиночные раздражения ЛОТ.

Контрольные животные стрессу не подвергались.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по непараметрическому критерию (U-критерий Вилкоксона—Манна—Уитни). Различия признавали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Аппликация агониста NMDA-рецепторов на срезы обонятельной коры мозга крыс с активной стратегией поведения до воздействия стресса сопровождалась градуальным возрастанием амплитуд NMDA-ответов (рис. 1). Изменения NMDA-ответов на агонист начинались через 1 мин, и амплитуда достигала максимума через 16 мин после начала аппликации. Затем происходило снижение NMDA-ответов, и их амплитуда возвращалась к изначальному уровню. Далее их амплитуда не изменялась и соответствовала исходным значениям (см. рис. 1).

Динамика изменений NMDA-ответов в срезах мозга крыс с активной стратегией поведения после стресса отличалась от характера развития во времени реакции в контрольных срезах (без воздействия стресса). Максимальная реакция NMDA-ответов наблюдалась раньше (11 мин, по оси абсцисс), чем в контрольных срезах (16 мин, ось абсцисс) после аппликации NMDA. Затем амплитуда NMDA-ответов снижалась, и к 31-й минуте действия агониста составляла 50% от значений в контрольных срезах. При дальнейшем действии агониста (61 мин, ось абсцисс) амплитуда NMDA-ответов не изменялась (см. рис. 1).

Анализ изменений амплитуд NMDA-ответов в срезах крыс с пассивной стратегией поведения показал, что аппликация агониста NMDA-рецепторов на срезы мозга крыс без воздействия стресса индуцировала незначительное увеличение активности NMDA-рецепторов, которое было кратковременным и инвертировалось в снижение. Такая депрессия развивалась постепенно и достигала 20% по сравнению с NMDA-ответами в срезах контрольной группы (61 мин, ось абсцисс) (рис. 2).

Для оценки функционального состояния NMDA-зависимых ответов после стресса и аппликации агониста был использован нейрофизиологический тест нейропластичности — тетанизация ЛОТ для определения развития ДПП/ДПД, которые в настоящее время рассматриваются как молекулярно-клеточная основа развития обучения и формирования памяти [11].

Вначале был определен спектр возникновения ДПП и ДПД в срезах мозга контрольных крыс с различными стратегиями поведения. Как видно из данных, представленных в табл. 1, в контрольных срезах мозга крыс с активной стратегией поведения возникало больше ДПП и меньше ДПД. В 5% срезов ДПП и ДПД отсутствовали (они были обозначены как «НР» — нет реакции).

Через 10 дней после стресса в срезах мозга крыс с активной стратегией поведения спектр нейропластических

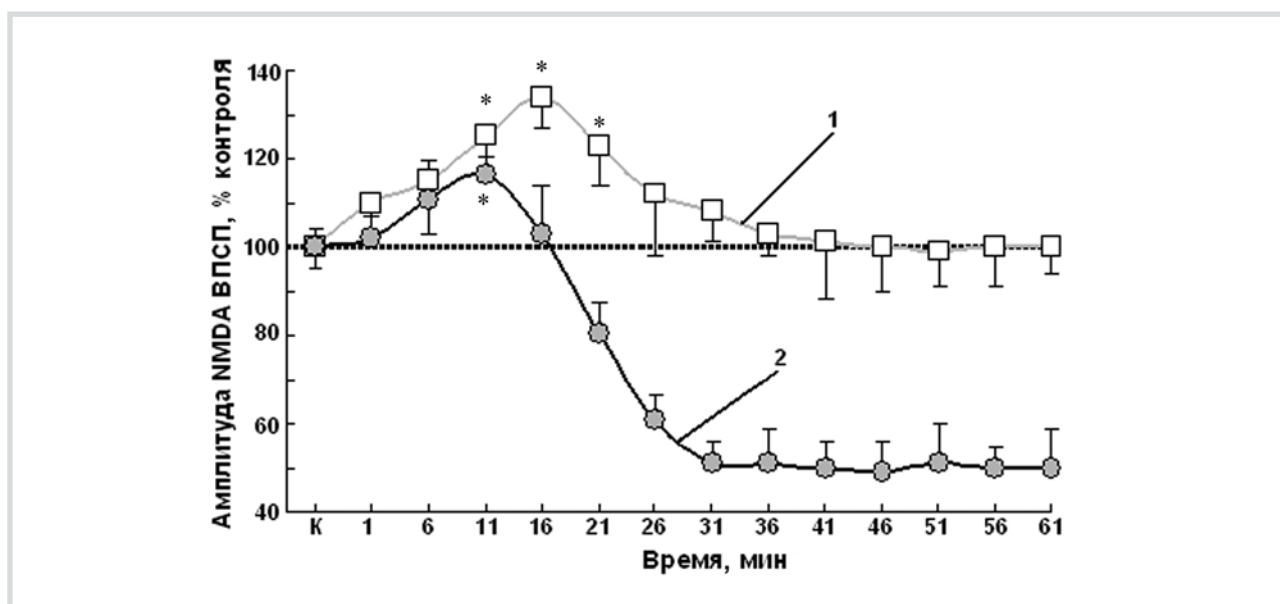


Рис. 1. Эффекты аппликации НМДА в концентрации 50 мкМ на активность НМДА-рецепторов в срезах мозга крыс с активной стратегией поведения.

Здесь и на рис. 2. Горизонтальная пунктирная линия – среднее значение амплитуды НМДА ВПСП в контрольных условиях при частоте стимуляции ЛОТ – 0,003 Гц в течение 15 мин ($n = 7$), для каждой точки. * – $p \leq 0,05$ достоверность различий от контрольных значений (U -критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

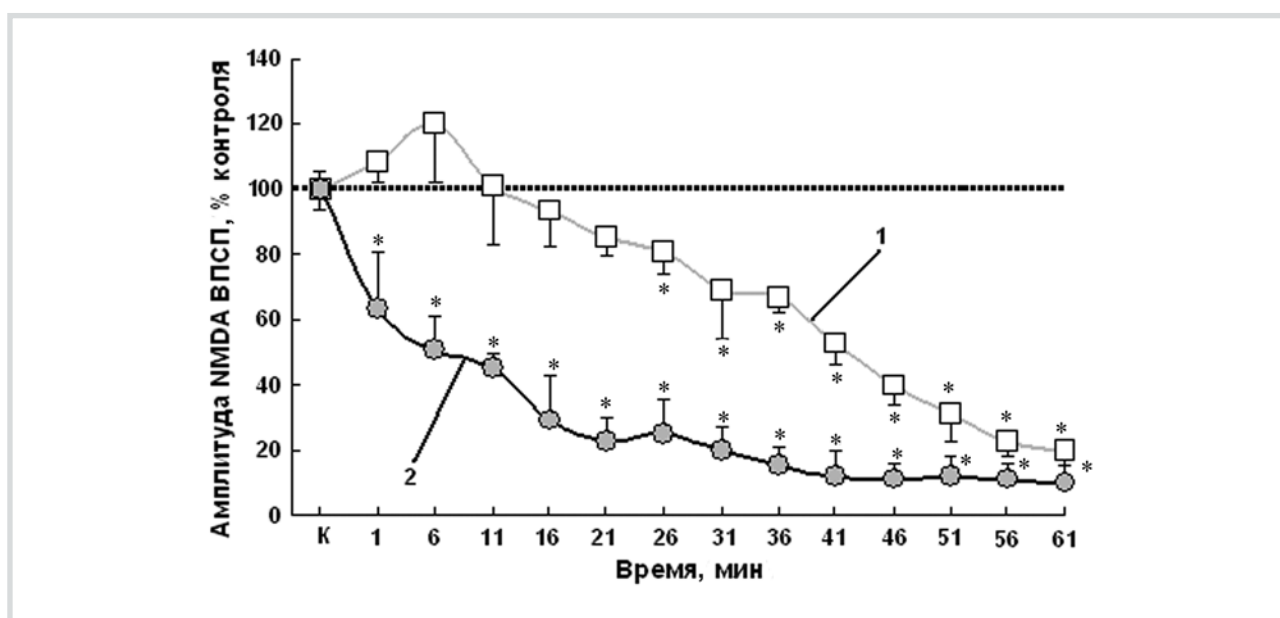


Рис. 2. Эффекты аппликации НМДА в концентрации 50 мкМ на активность НМДА-рецепторов в срезах мозга крыс с пассивной стратегией поведения.

$n=9$ для каждой точки. Остальные обозначения как на рис. 1.

Таблица 1. Частота развития ДПП, ДПА и НР в срезах мозга крыс с активной стратегией поведения после аппликации агониста NMDA-рецепторов

Серия экспериментов	Частота реакций, %		
	ДПП	ДПА	НР
Контроль (без стресса)	71	24	5
Через 10 дней после стресса	39	55	16

Таблица 2. Частота развития ДПП, ДПД и НР в срезах мозга крыс с пассивной стратегией поведения после аппликации NMDA-рецепторов

Серия экспериментов	Частота реакций, %		
	ДПП	ДПД	НР
Контроль (без стресса)	11	65	24
Через 10 дней после стресса	0	83	27

реакций изменялся. Так, в 55% срезов возникали ДПД и в 16% — НР. Уменьшилось число срезов, в которых развивались ДПП (39%) (см. табл. 1). Представленные данные указывают, что стрессирование крыс ухудшает развитие нейропластических реакций — у них в мозге чаще развиваются депрессивные явления (ДПД) или отсутствуют реакции (НР).

Характер пластических реакций в срезах мозга крыс с пассивной стратегией поведения — как в контроле, так и после стресса — менялся более значительно. В контрольной группе крыс (без стресса) после аппликации NMDA превалировало развитие ДПД (65%) либо наблюдались НР (24%). Развитие ДПП было незначительным и составляло 11% (табл. 2).

Через 10 дней после стресса в срезах мозга от пассивных крыс усилилось проявление того спектра реакции, который наблюдался в контрольной группе. Значительно возросла частота развития ДПД (83%) и блокировалось развитие ДПП (0). Частота НР после тетанизации сохранилась такой же, как в контроле (см. табл. 2).

Обсуждение

Таким образом, в настоящем исследовании было установлено, что активность NMDA-рецепторов в срезах мозга крыс с активной и пассивной стратегиями поведения меняется различным образом до и после стресса. Эту закономерность удалось выявить с использованием аппликации агониста NMDA-рецепторов на срезы мозга крыс. Было выявлено, что наиболее уязвимыми являются NMDA-зависимые механизмы в мозге крыс с пассивной стратегией поведения. Они отличались выраженным торможением реакций на аппликацию агониста NMDA-рецепторов. В те-

сте нейропластичности это проявлялось в блокировании развития ДПП, и наоборот, в увеличении частоты развития ДПД. NMDA-зависимые механизмы в срезах мозга крыс с активной стратегией поведения были более устойчивыми к действию стресса: активность реакций снижалась, но не блокировалась, и более того, в них чаще развивались нейропластические реакции — ДПП.

Установленные экспериментальные факты, свидетельствующие о существенных изменениях функционирования NMDA-рецепторов при развитии ПТСР в срезах мозга крыс с активной и пассивной стратегией поведения можно гипотетически объяснить различным субъединичным составом NMDA-рецепторов в мозге крыс с разными стратегиями поведения. Ионотропные NMDA-рецепторы — гетеротетрамерные структуры, образованные двумя субъединицами GluN1 и двумя субъединицами GluN2 или GluN3 [12], формируют ионные кальциевые каналы, участвующие в процессах возбуждения. Согласно данным литературы, функционирование NMDA-рецепторов зависит не только от состава субъединиц, а также от интенсивности их стимуляции [13]. Установлено, что GluN1 как обязательная субъединица играет главную роль в функционировании NMDA-рецепторов [12]. Полагают, что именно она важна для формирования адаптивных реакций организма [14–17] и развития патологии нервной системы при стрессовых воздействиях [17, 18].

Дальнейшие исследования субъединичного состава ионотропных глутаматных рецепторов NMDA-типа у крыс с разными стратегиями поведения могут позволить проверить высказанную выше гипотезу и провести поиск эффективных протективных препаратов, предупреждающих развитие ПТСР.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Kirkpatrick HA, Heller GM. Post-traumatic stress disorder: theory and treatment update. *International Journal Psychiatry Medicine*. 2014;47(4):337–346. <https://doi.org/10.2190/PM.47.4.h>
- Pfefferbaum B, Tucker P, Jeon-Slaughter H, Allen JR, Hammond DR, Whitteley SW. A pilot study of physiological reactivity in children and maternal figures who lost relatives in a terrorist attack. *Death Studying*. 2013;37(5):395–412. <https://doi.org/10.1080/07481187.2011.6449938>
- Шалыпина В.Г., Ракицкая В.В., Петрова Е.И. Роль кортикотропин-рилизинг-гормона в нарушениях поведения после неизбежного стресса у активных и пассивных крыс. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2005;55(2):241–246. [Shalyapina VG, Rakitskaya VV, Petrova EI. The role of corticotrophin-releasing hormone in behavioral disorders after unavoidable stress in active and passive rats. *Journal of Higher Nervous Activity*. 2005;55(2):241–246. (In Russ.)].
- Шалыпина В.Г., Вершинина Е.А., Ракицкая В.В., Рыжова Л.Ю., Семенова М.Г., Семенова О.Г. Изменение приспособительного поведения активных и пассивных крыс Вистар в водно-иммерсионной модели депрессии. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2006;56(4):543–547. [Shalyapina VG, Vershinina EA, Rakitskaya VV, Ryzhova LY, Semenova MG, Semenova OG. Changes in the adaptive behavior of active and passive Wistar rats in the water-immersion model of depression. *Journal of Higher Nervous Activity*. 2006;56(4):543–547. (In Russ.)].
- Мокрушин А.А., Хама-Мурад А.Х., Семенова О.Г., Шалыпина В.Г. Электрофизиологические характеристики депрессивных состояний у крыс с пассивной стратегией приспособительного поведения. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2008;94(2):230–237. [Mokrushin AA, Khama-Murad AKh, Semenova OG, Shalyapina VG. Electrophysiological characteristics of depressive states in rats with a passive strategy of adaptive behavior. *Russian Journal of Physiology I.M. Sechenov*. 2008;94(2):230–237. (In Russ.)].
- Беспалов А.Ю., Звартау Э.Э. *Нейропсихофармакология антагонистов NMDA-рецепторов*. 2000;245. [Bespalov AYU, Zvartau EE. *Neuropsychopharmacology of antagonists of NMDA receptor*. 2000;245. (In Russ.)].
- Masneuf S, Lowery-Gionta E, Colacicco G, Pleil KE, Li C, Crowley N, Flynn S, Holmes A, Kash T. Glutamatergic mechanisms associated with stress-induced amygdala excitability and anxiety-related behavior. *Neuropharmacology*. 2014;85:190–197. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.04.015>

8. Meyerhoff DJ, Mon A, Metzler T, Neylan TC. Cortical gamma-aminobutyric acid and glutamate in posttraumatic stress disorder and their relationships to self-reported sleep quality. *Sleep*. 2014;37(5):893-900. <https://doi.org/10.5665/sleep.3654>
9. Trullas R, Skolnick P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *European Journal Pharmacology*. 1990;185(1):1-10.
10. Шаляпина В.Г., Мокрушин А.А., Хама-Мурад А.Х., Семенова О.Г. Эффекты кортиколиберина на синаптическую передачу в срезах обонятельной коры мозга крыс в модели депрессии. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2008;94(8):952-961. [Shalyapina VG, Mokrushin AA, Khama-Murad AKh, Semenova OG. Effects of corticotropin-releasing hormone on synaptic transmission in sections of the olfactory cortex rat brain in the model of depression. *Russian Journal of Physiology I.M. Sechenova*. 2008;94(8):952-961. (In Russ.)].
11. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993;361(6407):31-39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>
12. Traynelis SF, Lonnig PW, Chris JMcB, Frank SM, Katie MV, Kevin KO, Kasper BH, Hongjie Y, Scott JM. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*. 2010;62(3):405-496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
13. Mayer ML. Structure and mechanism of glutamate receptor ion channel assembly, activation and modulation. *Current Opinion Neurobiology*. 2011;21:283-290. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.02.001>
14. Kaur J, Keeseey R, Magrys B, Liu H, Friedman LK. NR1 knockdown reveals CA1 injury during a developmental period of high seizure susceptibility despite reduced seizure activity. *Neuromolecular Medicine*. 2007;9:298-314. <https://doi.org/10.1007/s12017-007-8009-7>
15. Youn DH, Royle G, Kolaj M, Vissel B, Randic M. Enhanced LTP of primary afferent neurotransmission in AMPA receptor GluR2-deficient mice. *PAIN*. 2008;136:158-167. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.07.001>
16. Milnerwood AJ, Gladding CM, Pouladi MA, Kaufman AM, Hines RM, Boyd JD. Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice. *Neuron*. 2010;65:178-190. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.008>
17. Wright A, Vissel B. The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. *Front Molecular Neuroscience*. 2012;5:34-37. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00034.eCollection> 2012
18. Mahajan SS, Thai KH, Chen K, Ziff E. Exposure of neurons to excitotoxic levels of glutamate induces cleavage of the RNA editing enzyme, adenosine deaminase acting on RNA 2, and loss of GLUR2 editing. *Neuroscience*. 2011;25:305-315. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.027>