

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДОРСАЛЬНОГО И ВЕНТРАЛЬНОГО ОТДЕЛОВ ГИППОКАМПА КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КОМБИНИРОВАННОГО СТРЕССА С УЧЕТОМ ЭКСПРЕССИИ CASPASE-3 И GFAP

А.В. Смирнов^{1,4}, Н.В. Григорьева¹, М.Р. Экова¹, М.В. Шмидт^{1,4}, Д.С. Медников¹, И.Н. Тюренков², Д.В. Куркин², Е.В. Волотова², В.С. Замараев³

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

¹кафедра патологической анатомии, ²кафедра фармакологии и биофармации ФУВ,

³кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии с курсом клинической микробиологии;

⁴Волгоградский медицинский научный центр,

лаборатория морфологии, иммуногистохимии и канцерогенеза

Дорсальный отдел гиппокампа (ДОГ) отвечает за определенные формы обучения и памяти, а вентральная часть играет важную роль в реализации стресс-реакции и тревожных форм поведения. Работа выполнена на 20 белых крысах в возрасте 12 месяцев. Моделирование комбинированного стресса (пульсирующий яркий свет, громкий звук, вибрация) проводилось ежедневно по 30 минут в течение 7 дней в специальной камере, состоящей из 6 изолированных отсеков. У стрессированных животных ($n = 10$) в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа обнаружено уменьшение площади перикарионов нейронов (ППН), увеличение удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы, увеличение относительной площади GFAP-иммунореактивного материала. Кроме того, в ДОГ наблюдалось снижение относительной ППН, ширины пирамидного слоя и увеличение удельного количества caspase-3 иммунопозитивных перикарионов нейронов. При длительном комбинированном стрессовом воздействии у крыс в возрасте 12 месяцев наиболее выраженные изменения в пирамидном слое в ДОГ обнаружены в CA3, а в вентральном отделе гиппокампа (ВОГ) – в CA1.

Ключевые слова: гиппокамп, caspase-3, GFAP, стресс, крыса.

DOI 10.19163/1994-9480-2018-1(65)-82-86

MORPHOFUNCTIONAL CHANGES OF THE DORSAL AND VENTRAL HIPPOCAMPUS OF RATS IN MODELING THE COMBINED STRESS WITH CASPASE-3 AND GFAP EXPRESSION

A.V. Smirnov^{1,4}, N.V. Grigorieva¹, M.R. Ekova¹, M.V. Schmidt^{1,4}, D.S. Mednikov¹, I.N. Tyurenkov², D.V. Kurkin², E.V. Volotova², V.S. Zamaraev³

FSEI HE «The Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation,

¹Department of Pathological Anatomy,

²Department of Pharmacology and Biopharmacy of the Faculty of Physicians' Improvement,

³Department of Microbiology, Virology, Immunology with a Course in Clinical Microbiology;

⁴Volgograd Medical Research Center,

laboratory of morphology, immunohistochemistry and carcinogenesis

The dorsal hippocampus (DH) is responsible for certain forms of learning and memory, and the ventral hippocampus (VH) plays an important role in the realization of stress reactions and anxious forms of behavior. The study was performed on 20 white rats at the age of 12 months. Modeling of combined stress (pulsating bright light, loud sound, vibration) was conducted daily for 30 minutes for 7 days in a special chamber consisting of 6 isolated compartments. In stressed animals ($n = 10$), in the DH and VH, a decrease the area of the neuronal perikarya (ANP), an increase in the relative number of shrunken neurons with hyperchromatosis of the cytoplasm, an increase in the relative area of GFAP immunoreactive material was observed. In addition, the decrease in relative ANP, width of the pyramidal layer, and the increase in the relative amount of caspase-3-immunopositive neuronal perikarya were observed in DH. With prolonged combined stress in rats at the age of 12 months, the most pronounced changes in the pyramidal layer in the DPH are found in CA3, and in the VH – in CA1.

Key words: hippocampus, caspase-3, GFAP, stress, rat.

Стресс является одним из факторов риска различных нейropsychологических состояний, таких как депрессия, тревожные расстройства и деменция [7, 9]. Изменения в когнитивных процессах, связанных со стрессом, таких как обучение и память, а также пове-

денческие нарушения зависят от нейропластических механизмов в гиппокампе [2].

Несмотря на значительный интерес к проблеме, основная масса работ имеет функциональную направленность по изучению дорсального и вентрального

отделов гиппокампа [6], при этом морфологические особенности данных отделов остаются малоизученными.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение структурных изменений в СА1 и СА3 дорсального и вентрального отделов гиппокампа у 12-месячных крыс при моделировании комбинированного стресса с учетом экспрессии caspase-3 и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP).

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на 20 нелинейных белых крысах-самцах в возрасте 12 месяцев (ФГПУ Питомник лабораторных животных «Рапполово») с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». 1 группа – контрольные крысы ($n = 10$), 2 группа – стрессированные крысы ($n = 10$). Моделирование стрессового воздействия проводилось путем комбинирования нескольких стрессорных раздражителей (пульсирующий свет, громкий звук, вибрация [3]. Головной мозг фиксировали в нейтральном забуференном 10%-м формалине. Окрашивание срезов осуществлялось тионином по методу Ниссля, определяли ряд морфометрических параметров (табл.), экспрессию caspase-3 (поликлональные кроличьи антитела GeneTex, Inc., 1:100) и GFAP (мышинные моноклональные антитела Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, USA, RTU).

На срезах с применением иммуногистохимического метода оценивали интенсивность окрашивания в баллах от 0 до 3 (0 – иммунонегативная реакция; 1 – слабо выраженное окрашивание; 2 – умеренно выраженное окрашивание; 3 – максимально выраженное окрашивание), уровень экспрессии caspase-3 путем подсчета удельного количества иммунопозитивных нейронов; с использованием программы ZEN 1.1.2.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) рассчитывали относительную площадь GFAP-иммунореактивного материала (ИРМ). Статистическую обработку данных

проводили с использованием пакетов программ Statistica 6,0 (StatSoft, USA). Обобщенные данные представляли в виде медианы (Me) с указанием интерквартильного интервала (Q1–Q3), где Q1 – 25 процентиля, Q3 – 75 процентиля. Различия между группами оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney, U-test) и считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При нейрогистологическом исследовании СА1 ДОГ 12-месячных стрессированных крыс существенных различий в строении пирамидного слоя, по сравнению с крысами контрольной группы, обнаружено не было (табл.). Напротив, в пирамидном слое СА1 вентрального отдела гиппокампа (ВОГ) было выявлено достоверное увеличение удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы на 17 % ($p < 0,05$), по сравнению с контрольной группой животных (табл.).

Наиболее выраженные изменения у 12-месячных крыс, подвергнутых стрессовому воздействию, отмечались в пирамидном слое СА3 ДОГ. Удельное количество сморщенных гиперхромных нейронов в группе 12-месячных стрессированных крыс увеличивалось на 15,6 % ($p < 0,05$) (табл.).

В СА1 ДОГ у животных, подвергнутых комбинированному стрессу, нейроны пирамидного слоя располагались в 2–3 слоя, в СА3 – в 2–6 слоев. По сравнению с крысами контрольной группы в СА1 у стрессированных животных отмечалось уменьшение ширины пирамидного слоя на 8,4 % ($p < 0,05$), в СА3 – на 13,1 % ($p < 0,05$) (табл.). В пирамидном слое СА1 и СА3 ВОГ нейроны располагались в 3–6 слоев.

Морфометрическая оценка средней ППН в пирамидном слое СА1 и СА3 ДОГ продемонстрировала значимое уменьшение данного параметра у стрессированных крыс по сравнению с контрольными животными ($p < 0,05$) (табл.). Достоверные различия в снижении

Изменение морфометрических параметров нейронов пирамидного слоя гиппокампа крыс, Me (Q₁–Q₂)

| Морфометрические показатели | Дорсальный отдел гиппокампа | | | | Вентральный отдел гиппокампа | | | |
|---|-----------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| | контроль | | стресс | | контроль | | стресс | |
| | СА1 | СА3 | СА1 | СА3 | СА1 | СА3 | СА1 | СА3 |
| Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы, % | 3,9 (1,7–10,9) | 10 (6,8–14) | 5,8 (1,1–14,9) | 25,6* (14,6–46,4) | 4,9 (3,1–15,1) | 14,2 (4,8–34,9) | 21,9* (12,3–54,7) | 14,7 (6,6–43,3) |
| Ширина пирамидного слоя, мкм | 36,7 (31,2–42,8) | 55 (43,8–70,7) | 33,6* (28,4–36,3) | 47,3* (36,7–59,7) | 48,9 (44,6–61,2) | 58,6 (50,4–73,8) | 51,7 (44,4–62,4) | 61,2 (54,4–68,9) |
| Площадь перикарионов нейронов, мкм ² | 117,9 (101,7–136,2) | 140,7 (107,1–172,8) | 100* (83,9–119,1) | 126,4* (85,7–164,1) | 105,5 (84,9–132,1) | 158,8 (130,4–190) | 100,4 (83–118,9) | 132,8* (89,8–166,7) |
| Относительная площадь перикарионов нейронов, % | 42,5 (37,2–45,6) | 41,3 (36,1–46,9) | 41,1 (31,3–48,9) | 35,4* (30,5–44,8) | 39,6 (35,1–44,9) | 38,2 (33,3–43,6) | 41,1 (30,2–46,8) | 35,4 (31,3–42,5) |

* $p < 0,05$ – значимые различия при сравнении с группой контроль, критерий Манна-Уитни.

относительной ППН обнаруживались в пирамидном слое СА3 ($p < 0,05$) (табл.). В ВОГ у животных, подвергнутых действию комбинированного стресса, средняя площадь перикарионов снижалась только в СА3 ($p < 0,05$).

При оценке результатов иммуногистохимического (ИГХ) исследования ДОГ крыс, находившихся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса, с использованием антител против caspase-3, в отличие от крыс контрольной группы, в цитоплазме нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 преобладала умеренно выраженная экспрессия ИРМ (2 балла) (рис. 1).

Caspase-3-ИРМ локализовался как в цитоплазме неизмененных перикарионов нейронов, так и сморщенных. В отдельных глиоцитах молекулярного, радиального и пирамидного слоев отмечалась выраженная экспрессия ИРМ. Удельное количество иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое СА1 ДОГ у стрессированных животных достоверно увеличивалось на 36,4 % ($p < 0,05$), по сравнению с контрольной группой, и составило 36,4 (25–47,6) %. В СА3 удельное количество иммунопозитивных нейронов увеличивалось на 13,8 % ($p < 0,05$) и у крыс, находившихся под влиянием комбинированного стресса, составило 13,8 (7,7–40) %.

При оценке результатов ИГХ исследования ВОГ крыс с использование антител к caspase-3 в цитоплазме большинства перикарионов нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3, как и в контрольной группе животных, отмечалась иммунонегативная реакция. В единичных полях зрения пирамидного слоя СА1 и СА3 встречались нейроны со слабовыраженной гранулярной цитоплазматической экспрессией в перикарионах. При этом достоверно значимых различий в изменении удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 между контрольными и стрессированными животными обнаружено не было.

При ИГХ исследовании ДОГ крыс, находившихся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса, с использованием антител к GFAP наблюдалась выраженная цитоплазматическая экспрессия в астроцитах пирамидного, радиального и молекулярного слоев СА1 и СА3 (3 балла). Однако в отличие от животных контрольной группы GFAP-иммунопозитивные астроциты концентрировались преимущественно в прилегающих к пирамидному, краевому и радиальному слоям и GFAP-ИРМ в отростках астроцитов характеризовался умеренной и выраженной степенью экспрессии (рис. 2).

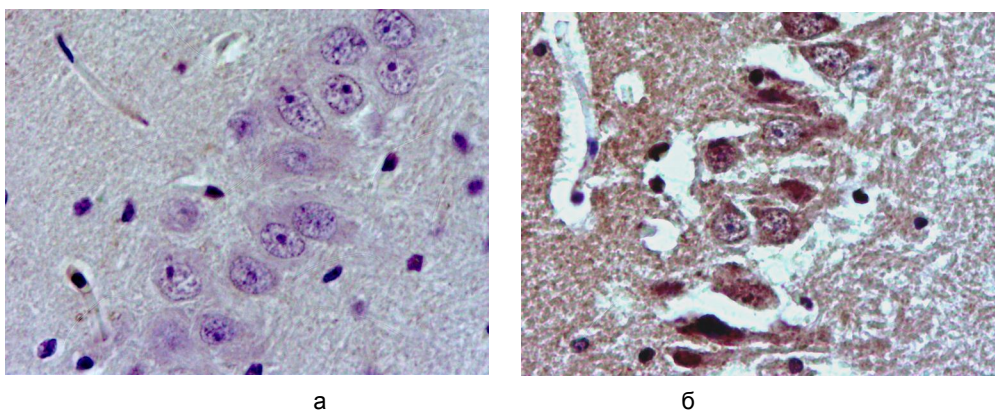


Рис. 1. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12 месяцев (а) и крысы в возрасте 12 месяцев, находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против caspase-3, докраска гематоксилином. Ув. X 400

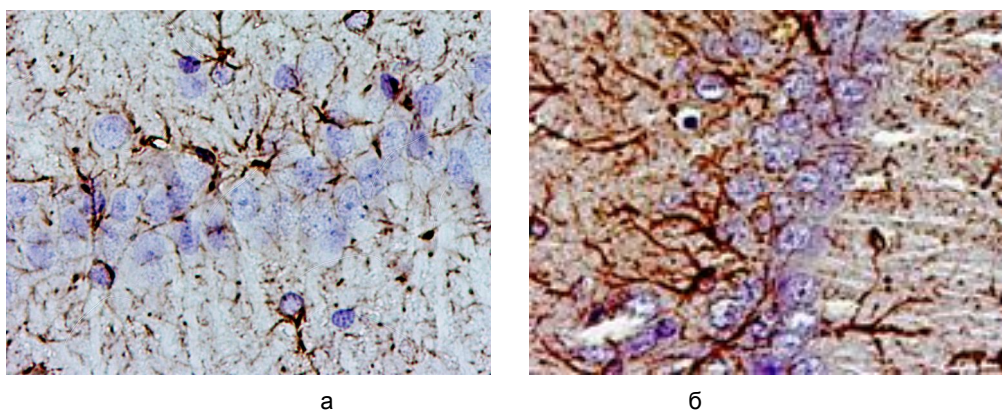


Рис. 2. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12 месяцев (а) и крысы в возрасте 12 месяцев, находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против GFAP, докраска гематоксилином. Ув. X 400

У 12-месячных стрессированных крыс в СА1 относительная площадь GFAP-ИРМ увеличилась на 5,2 % ($p < 0,05$) и составила 16,4 (15,3–19,1) %. В СА3 относительная площадь ИРМ составила 20,4 (17,8–27,7) % и увеличилась на 8,9 % ($p < 0,05$). При морфометрическом исследовании СА1 и СА3 было обнаружено достоверное повышение относительной площади ИРМ в ВОГ стрессированных крыс, по сравнению с контрольной группой животных. У стрессированных крыс в СА1 относительная площадь GFAP-ИРМ увеличилась на 5,1 % ($p < 0,05$) и составила 12,7 (10,3–14,6) %. В СА3 относительная площадь ИРМ составила 11,8 (10,9–15) % и увеличилась на 2,6 % ($p < 0,05$). Обнаруженное нами при моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 12 месяцев в СА1 и СА3 дорсального и вентрального отделов гиппокампа прогрессирующее увеличение астроцитарной глии, характеризующееся увеличением относительной площади GFAP-ИРМ в СА1 и в СА3, отражает адаптивный результат реактивного астроглиоза [10].

Выявленное в нашем эксперименте преимущественно в СА3 ДОГ и в СА1 ВОГ сочетание процессов повреждения нейронов пирамидного слоя с атрофическими изменениями у 12-месячных крыс, подвергнутых длительному воздействию комбинированного стресса, может быть связано с метаболическими и морфофункциональными особенностями нейронов различных отделов гиппокампа [1] и функциональными регион-специфическими ответами гиппокампа на стрессоры. В процессе развития необратимых изменений нейронов выделяют несколько механизмов клеточной гибели, в первую очередь – апоптоз. В нашем эксперименте в пирамидном слое ДОГ обнаружено увеличение удельного количества caspase-3 иммунопозитивных нейронов в СА1 и в СА3 у 12-месячных стрессированных животных, что свидетельствует о необратимых изменениях нейронов пирамидного слоя [8] и сопровождается развитием наиболее выраженных признаков повреждения с признаками аутофагии в ДОГ, повышением экспрессии NO-синтазы с развитием NO-зависимых механизмов повреждения, преобладающих в ВОГ у более молодых животных и в ДОГ – у более старых, повышение экспрессии нейротрофина BDNF в нейронах и астроцитах [4]. В ВОГ значимых различий в экспрессии caspase-3 обнаружено не было, что, по-видимому, связано с другими каспаза-независимыми механизмами клеточной гибели. Другим механизмом повреждения нейронов гиппокампа при хроническом стрессе и нейродегенеративных расстройствах является эксайтотоксическое действие высоких концентраций глутамата, что ведет к накоплению поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы-1 (PARP-1) и ядерной транслокации AIF из митохондрий [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при длительном комбинированном стрессовом воздействии у крыс в возрасте 12 ме-

сяцев, по сравнению с контролем, в СА3 ДОГ преобладают следующие признаки: выраженные повреждения нейронов пирамидного слоя, которые характеризуются увеличением удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы на 15,6 % ($p < 0,05$), увеличением удельного количества caspase-3-иммунопозитивных нейронов на 13,8 % ($p < 0,05$); атрофические изменения, которые характеризуются уменьшением ширины пирамидного слоя на 13,1 % ($p < 0,05$), снижением средней ППН на 10,2 % ($p < 0,05$), снижением относительной ППН на 5,9 % ($p < 0,05$); реактивный астроглиоз в виде возрастания относительной площади GFAP-иммунореактивного материала на 8,9 % ($p < 0,05$). Напротив, в ВОГ данные признаки проявляются преимущественно в СА1, что может свидетельствовать о развитии функционального регион-специфического ответа гиппокампа на стрессоры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Максимова К.Ю., Стефанова Н.А., Логвинов С.В. Морфологические изменения нейронов в гиппокампе крыс при преждевременном старении // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – № 1 (13). – С. 56–61.
2. Смирнов А.В., Григорьева Н.В., Экова М.Р., Шмидт М.В., Медников Д.С., Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Волотова Е.В. Характеристика структурных изменений дорсального отдела гиппокампа крыс на этапах старения с учетом экспрессии сериновой рацемазы // Вестник ВолГМУ. – 2016. – № 3 (59). – С. 13–16.
3. Тюренков И.Н., Багметова В.В., Чернышева Ю.В., Бородин Д.Д. Депрессивное состояние у крыс при хроническом комбинированном стрессе, вызванное сочетанием разномодальных стрессоров // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – № 9 (99). – С. 1045–1056.
4. Экова М.Р., Смирнов А.В., Григорьева Н.В., Тюренков И.Н. Особенности экспрессии маркера аутофагии beclin-1 в дорсальном отделе гиппокампа крыс при комбинированном стрессе // Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии. Материалы Всероссийской конференции молодых специалистов. – 2017. – С. 131–133.
5. Fujikawa D.G. Acute Neuronal Injury: the role of excitotoxic programmed cell death mechanisms. – New York: Spring, 2010. – 306 p.
6. Grigoryan G., Segal M. Lasting differential effects on plasticity induced by prenatal stress in dorsal and ventral hippocampus // Neural. Plasticity. – 2016. – Vol. 2016. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2540462>.
7. Hill M.N., Hellems K.G., Verma P., Gorzalka B.B., Weinberg J. Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression // Neurosci. Biobehav. Rev. – 2012. – Vol. 36. – P. 2085–2117.
8. Mattson M.P., Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability // Nat. Rev. Neurosci. – 2006. – № 4 (7). – P. 278–294.
9. McEwen B.S., Nasca C., Gray J.D. Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex // Neuropsychopharmacology. – 2016. – № 1 (41). – P. 3–23.

10. Pekny M., Wilhelmsson U., Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis // *Neurosci. Lett.* – 2014. – Vol. 565. – P. 30–38.

REFERENCES

1. Maksimova K.Ju., Stefanova N.A., Logvinov S.V. Morfologicheskie izmenenija neyronov v gippokampe krysa pri prezhddevremennom starenii [Morphological changes of neurons in the hippocampus of rats in premature aging]. *Bjulleten' sibirskoj mediciny* [Bulletin of Siberian Medicine], 2014, no. 1 (13), pp. 56–61. (In Russ., Abstr. In Engl.)
2. Smirnov A.V., Grigor'eva N.V., Jekova M.R., Shmidt M.V., Mednikov D.S., Tjurenkov I.N., Kurkin D.V., Volotova E.V. Harakteristika strukturnyh izmenenij dorsalnogo otdela gippokampa krysa na jetapah starenija s uchetom jekspressii serinovoj racemazy [Characteristics of the structural changes of dorsal hippocampus considering serine racemase expression in aging rats]. *Vestnik VolgGMU* [Bulletin of VolgGMU], 2016, no. 3 (59), pp. 13–16. (In Russ., Abstr. In Engl.)
3. Tjurenkov I.N., Bagmetova V.V., Chernysheva Ju.V., Borodin D.D. Depressivnoe sostojanie u krysa pri hronicheskom kombinirovannom stresse, vyzvannoe sochetaniem raznomodal'nyh stressorov [Depressive state in rats with chronic combined stress caused by a combination of multimodal stressors]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova* [Russian Journal of Physiology named after I. M. Sechenov], 2013, no. 9 (99), pp. 1045–1056. (In Russ., Abstr. In Engl.)
4. Jekova M.R., Smirnov A.V., Grigor'eva N.V., Tjurenkov I.N. Osobennosti jekspressii markera autofagii beclin-1 v dorsal'nom otdela gippokampa krysa pri kombinirovannom stresse [Features of the expression of the marker of autophagy beclin-1 in the dorsal hippocampus of rats under combined stress]. In *Aktual'nye voprosy fundamental'noj, jeksperimental'noj i klinicheskoy morfologii. Materialy Vserossijskoj konferencii molodyh specialistov* [Actual questions of fundamental, experimental and clinical morphology Materials of the All-Russian Conference of Young Specialists.]. – 2017, pp. 131–133.
5. Fujikawa D.G. *Acute Neuronal Injury: the role of excitotoxic programmed cell death mechanisms*. New York: Springer, 2010, 306 p.
6. Grigoryan G., Segal M. Lasting differential effects on plasticity induced by prenatal stress in dorsal and ventral hippocampus. *Neural. Plasticity*, 2016, Vol. 2016. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2540462>.
7. Hill M.N., Hellems K.G., Verma P., Gorzalka B.B., Weinberg J. Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2012, Vol. 36, pp. 2085–2117.
8. Mattson M.P., Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2006, no. 4 (7), pp. 278–294.
9. McEwen B.S., Nasca C., Gray J.D. Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 2016, no. 1 (41), pp. 3–23.
10. Pekny M., Wilhelmsson U., Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci. Lett.*, 2014, vol. 565, pp. 30–38.

Контактная информация

Экова Мария Рафаэлевна – ассистент кафедры патологической анатомии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: maria.ekova@mail.ru