



Морфофункциональные изменения слизистой оболочки пищеварительного тракта крыс в модели посттравматического стрессового расстройства*

Забельникова А.М., Кирик О.В., Мацулевич А.В., Грефнер Н.М., Цикунов С.Г., Коржевский Д.Э., Абдурасулова И.Н.
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»,
(ул. Академика Павлова, д. 12, г. Санкт-Петербург, 197022, Россия)

Для цитирования: Забельникова А.М., Кирик О.В., Мацулевич А.В., Грефнер Н.М., Цикунов С.Г., Коржевский Д.Э., Абдурасулова И.Н. Морфофункциональные изменения слизистой оболочки пищеварительного тракта крыс в модели посттравматического стрессового расстройства. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2025;(12): 177–185 doi: 10.31146/1682-8658-ecg-244-12-177-185

✉ Для переписки:

Забельникова

Александра

Михайловна

zabel.am@yandex.ru

Забельникова Александра Михайловна, лаборант-исследователь лаборатории нейробиологии интегративных функций мозга; лаборант-исследователь лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы

Кирик Ольга Викторовна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы

Мацулевич Анна Викторовна, научный сотрудник лаборатории нейробиологии интегративных функций мозга

Грефнер Надежда Михайловна, ведущий инженер лаборатории нейробиологии интегративных функций мозга

Цикунов Сергей Георгиевич, д.м.н., заведующий лабораторией психофизиологии эмоций

Коржевский Дмитрий Эдуардович, д.м.н., профессор; заведующий лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы

Абдурасулова Ирина Николаевна, к.б.н., заведующий лабораторией нейробиологии интегративных функций мозга

Резюме

* Иллюстрация 1

к статье –

на цветной

вклейке в журнал

(стр. IV).

Хронический стресс приводит к психическим расстройствам, включая посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) и заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), которые часто взаимосвязаны. Однако ПТСР может развиваться после сильного острого стресса, каким является витальный стресс. Какие происходят при этом повреждения ЖКТ не изучено.

Цель. Исследование изменений слизистой оболочки пищеварительного тракта в отдаленном периоде после однократного стрессового воздействия угрозы жизни.

Материалы и методы. Поведенческую активность (общую двигательную, ориентировочно-исследовательскую деятельность, тревожность) крыс оценивали в тесте «Открытое поле» на 16-й день после стресса. Гистологическое исследование ткани тонкой и толстой кишки включало морфометрический анализ длины ворсинок и глубины крипт, количества бокаловидных клеток (окрашивание альциановым синим), оценку пролиферативной активности кишечного эпителия (иммуногистохимическая реакция на фосфорилированный гистон H3), ультраструктуры энтероцитов и колоноцитов (электронная микроскопия).

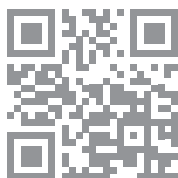
Результаты исследования. В отдаленном периоде после однократного воздействия стресса угрозы жизни у крыс развились проявления ПТСР в виде повышенной тревожности и сниженной исследовательской активности, которые сопровождалась морфологическими изменениями слизистой оболочки кишечника. В толстой кишке увеличивалась глубина крипт, в тонкой кишке удлинялись ворсинки, а в криптах возрастало количество бокаловидных клеток и уменьшалось количество клеток, иммунопозитивных по фосфорилированному гистону H3. В энтероцитах и колоноцитах обнаружено разрушение микроворсинок и митохондрий, а также показана транслокация бактерий в эпителиальный пласт. Выявленные изменения могут свидетельствовать о нарушении созревания и миграции бокаловидных клеток на фоне общего снижения пролиферативной активности эпителия, а также о повреждении кишечного барьера.

Заключение. Развитие ПТСР после однократного эпизода витального стресса сопровождается структурно-функциональными перестройками в слизистой оболочке кишечника и нарушением целостности кишечного барьера. Это необходимо учитывать при лечении постстрессовых расстройств и проводить терапию, направленную на восстановление структуры и функции кишечного барьера.

Ключевые слова: витальный стресс, посттравматическое стрессовое расстройство, слизистая оболочка, пищеварительный тракт

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

EDN: VXIGNZ



<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-244-12-177-185>

Structural and functional alterations in the gastrointestinal mucosa of rats in a PTSD model*

A.M. Zabelnikova, O.V. Kirik, A.V. Matsulevich, N.M. Grefner, S.G. Tsikunov, D.E. Korzhevskii, I.N. Abdurasulova
Institute of Experimental Medicine, (12 Academic Pavlov st, Saint Petersburg 197022, Russia)

For citation: Zabelnikova A.M., Kirik O.V., Matsulevich A.V., Grefner N.M., Tsikunov S.G., Korzhevskii D.E., Abdurasulova I.N. Structural and functional alterations in the gastrointestinal mucosa of rats in a PTSD model. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2025;(12): 177–185. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-244-12-177-185

✉ **Corresponding author:**

Alexandra M. Zabelnikova
zabel.am@yandex.ru

Alexandra M. Zabelnikova, Research Assistant, Laboratory of Neurobiology of Integrative Brain Functions; Research Assistant, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System; ORCID: 0009–0002–2618–7670
Olga V. Kirik, PhD in Biological Sciences; Senior Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System; ORCID: 0000–0001–6113–3948, Scopus Author ID: 27171304100
Anna V. Matsulevich, Researcher, Laboratory of Neurobiology of Integrative Brain Functions; ORCID: 0000–0002–0030–9548, Scopus Author ID: 57190964381
Nadezhda M. Grefner, Lead Engineer, Laboratory of Neurobiology of Integrative Brain Functions; ORCID: 0009–0005–9795–1180, Scopus Author ID: 6505821303
Sergey G. Tsikunov, MD, Dr. Sci. (Doctor of Medical Sciences); Head of the Laboratory of Psychophysiology of Emotions; ORCID: 0000–0002–7097–1940, Scopus Author ID: 6506948997
Dmitrii E. Korzhevskii, MD, Dr. Sci. (Doctor of Medical Sciences); Professor; Head of the Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System; ORCID: 0000–0002–2456–8165, Scopus Author ID: 12770589000
Irina N. Abdurasulova, PhD in Biological Sciences; Head of the Laboratory of Neurobiology of Integrative Brain Functions; ORCID: 0000–0003–1010–6768, Scopus Author ID: 22233604700

Summary

* **Illustration 1 to the article are on the colored inset of the Journal (p. IV).**

Chronic stress contributes to mental disorders, including post-traumatic stress disorder (PTSD) and gastrointestinal (GI) diseases, which frequently exhibit comorbidity. However, PTSD can also develop following severe acute stress, such as life-threatening stress. The associated GI tract damage remains poorly understood.

Aim. To investigate long-term changes in the digestive tract mucosa following a single life-threatening stress exposure.

Materials and Methods. On day 16 post-stress, rat behavioral activity was assessed using the Open Field test (evaluating general locomotion, exploratory behavior, anxiety-like responses). Histological analysis of the digestive tract included morphometric measurements of villus length and crypt depth, quantification of goblet cells (Alcian blue staining), and assessment of proliferative activity (immunohistochemical detection of phosphorylated histone H3).

Results. In the long-term period following a single life-threatening stress exposure, rats developed PTSD-like manifestations characterized by increased anxiety and decreased exploratory behavior, accompanied by morphological alterations in the intestinal mucosa. The small intestine showed increased villus length, while the large intestine displayed deeper crypts. Small intestinal crypts demonstrated an elevated number of goblet cells and a reduced count of phosphorylated histone H3-immunopositive cells. Ultrastructural analysis revealed microvilli and mitochondrial damage in enterocytes and colonocytes, along with bacterial translocation into the epithelial layer. These findings collectively suggest impaired goblet cell maturation and migration against a background of suppressed epithelial proliferation, indicating substantial intestinal barrier compromise.

Conclusion. PTSD development following acute life-threatening stress induces both structural and functional reorganization of the intestinal mucosa with barrier integrity disruption, underscoring the clinical need for therapeutic strategies targeting intestinal barrier restoration in post-stress disorder management.

Keywords: life-threatening stress, post-traumatic stress disorder (PTSD), mucosa, digestive tract

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Введение

Посттравматическое стрессовое расстройство – это спектр симптомов, связанных с одним психотравмирующим событием, таким как угроза жизни. Острый витальный стресс является мощным стимулом, способным вызвать стойкие психоэмоциональные и физиологические изменения, затрагивая при этом центральную нервную систему (ЦНС), а также висцеральные органы, прежде всего пищеварительный тракт. У пациентов с ПТСР по сравнению с общей популяцией, чаще встречаются пептические язвы и синдром раздраженного кишечника [1]. Такая коморбидность расстройств может объясняться двусторонней регуляцией между ЦНС и желудочно-кишечным трактом (ЖКТ) через ось «кишечник-мозг» [2, 3, 4]. В настоящее время нарушения в ЖКТ рассматриваются как потенциальный фактор одного из звеньев патогенеза постстрессовых расстройств [1].

Целостность кишечного барьера играет ключевую роль в поддержании гомеостаза организма. Он включает в себя слой эпителиальных клеток, плотные межклеточные контакты, слизистый слой, секретируемый бокаловидными клетками, иммунные клетки, микробиоту и её метаболиты, включая короткоцепочечные жирные кислоты [4, 5]. Психологический стресс нарушает регуляцию барьерной функции за счёт активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и секреции глюкокортикоидов, что приводит к разрушению плотных контактов, нарушению целостности эпителиального барьера («синдром дырявого кишечника») и способствует развитию хронического воспаления [6, 7]. Это также сопровождается модуляцией иммунного ответа, что облегчает транслокацию бактерий и их токсинов в подлежащие ткани и кровотоки [8, 9]. В результате это может способствовать развитию различных заболеваний [5, 10].

Известно, что стресс может представлять собой как адаптивный фактор, так и приводить к развитию патологий, в частности, витальный стресс является одной из причин развития посттравматических стрессовых расстройств. Кроме того, стресс ассоциирован с развитием таких заболеваний ЖКТ, как синдром раздраженного кишечника (СРК),

диспепсия, воспалительные заболевания кишечника (болезнь Крона, язвенный колит) и др. [11]. Стресс-индуцированные изменения включают морфологические изменения слизистой оболочки кишки, такие как изменение длины ворсинок, глубины крипт, снижение уровня пролиферативной активности энтероцитов и уменьшение числа бокаловидных клеток [12]. При хроническом стрессе чаще обнаруживаются укороченные ворсинки и уменьшенное количество бокаловидных клеток. Относительно глубины крипт в литературе представлены противоречивые данные [13, 14]. Действие острого витального стресса на структуру ЖКТ, особенно в отдалённом периоде, изучено недостаточно.

Помимо изменений в висцеральных органах, острый стресс оказывает влияние и на поведение, и в некоторых случаях приводит к развитию тревожных и депрессивных расстройств, а также посттравматического стрессового расстройства (ПТСР). Ранее было показано [15], что тревожность является ранним маркером постстрессовых нарушений поведения. Так у самцов крыс, переживших однократный витальный стресс, отмечено выраженное тревожное поведение, реакции страха и избегание. Некоторые поведенческие нарушения нивелировались с течением времени, однако повышенная тревожность и депрессивно-подобные проявления сохранялись у животных даже через 2 месяца после стрессового воздействия [16].

В настоящее время активно изучаются нейроэндокринные и иммунные механизмы развития постстрессовых расстройств [17, 18], но роль изменений, происходящих в висцеральных органах, например, в пищеварительном тракте, и их вклад в формирование тревожных и других симптомов постстрессовых расстройств, остаются недостаточными раскрытыми. Дальнейшее изучение изменений слизистой оболочки пищеварительного тракта на фоне постстрессовых нарушений может способствовать раскрытию механизмов патогенеза подобных состояний. В связи с этим целью данной работы было исследование изменений слизистой оболочки пищеварительного тракта в отдалённом периоде после однократного стрессового воздействия угрозы жизни.

Материалы и методы

Животные

Исследование было выполнено на самцах популяции Wistar в возрасте 6 месяцев, массой 320–360 г (n=28). Животных содержали в стандартных условиях вивария ФГБНУ «ИЭМ» при свободном доступе к корму (ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия, энергетическая ценность 295 ккал/100 г) и

воде, при световом режиме 12 часов день: 12 часов ночь. Крысы были разделены на две равновесные группы: контрольную группу (К) составили крысы, не подвергавшиеся стрессу (n=14), группу «стресс» (С) – крысы, пережившие ситуацию угрозы жизни (n=14).

Стресс угрозы жизни

Моделирование стресса угрозы жизни осуществляли, как описано ранее [15], воспроизводя ситуацию наблюдения группой крыс за гибелью своего

сородича при атаке хищника – тигрового питона. Данная модель хорошо изучена и приводит к развитию у крыс ПТСР [14].

Оценка поведения в тесте «Открытое поле»

Оценка локомоторной активности, ориентировочно-исследовательской активности и эмоционального состояния крыс осуществлялась в тесте «Открытое поле» на 16-й день после стресса. Использовалась арена круглой формы (НПК Открытая Наука, Россия). В течение 3-х минут теста производили видеосъемку поведения крыс с дальнейшей обработкой видеофайлов в режиме offline с помощью программ «Treking» и «Open field», разработанными в Физиологическом отделе им.

И.П. Павлова ФГБНУ «ИЭМ». Регистрировали следующие показатели: длина пройденной дистанции, время локомоции, количество посещений и время, проведенное в периферической и центральной зонах арены, а также этологические показатели (вертикальные стойки и стойки с упором, обследованные норки, груминг). Для каждого поведенческого акта определяли количество и суммарную длительность.

Оценка морфологических изменений кишечника

На 18-й день после стрессового воздействия животных подвергали декапитации в состоянии глубокого эфирного наркоза. Для дальнейших морфологических исследований извлекали фрагменты тонкой и толстой кишки (длиной 3 см, n=5 в каждой группе). Образцы тканей фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида в течение 24 ч [19]. Обезвоживали и заливали в парафин по общепринятой методике [20]. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5 мкм на ротационном микротоме (Rotary 3003 PFM, Германия).

Окрашивание препаратов осуществляли красителями: альциановый синий [19], иммуногистохимическую реакцию для выявления фосфорилированного гистона H3 (ФГН3) проводили с использованием первичных поликлональных кроличьих антител (ab5176, Abcam, Великобритания). В качестве вторичных антител использовали HRP Conjugate из набора Reveal Polyvalent HRP DAB

Detection System (SPD-015, Spring Bioscience, США). Образование продукта гистохимической реакции контролировали под микроскопом после нанесения DAB (DAB2-Component, Spring Bioscience, США). После ИГХ реакции срезы подкрашивали альциановым синим.

Полученные препараты анализировали на микроскопе (Olimpus CX41, Япония), оснащённом цифровой камерой (M1chrome 5 Pro Tucsen, Китай). Обработку и оценку полученных изображений производили с помощью компьютерной программы Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/>) [21]. Подсчёт бокаловидных клеток и иммунопозитивных клеток фосфорилированного H3, измерение длины ворсинок и глубину крипт осуществляли по пяти полям зрения в рамке 328.2 × 246.2 мкм на увеличении ×40 для каждого случая. Количество клеток определяли на единицу площади (1 мм²).

Электронная микроскопия

Подготовку образцов тонкой и толстой кишки для электронной микроскопии готовили по общепринятой методике [22]. Фрагменты тонкой и толстой кишки размером 2.5 × 2.5 мм фиксировали в 2% растворе глутаральдегида на фосфатном буфере (PBS) в течение 2 часов, промывали в PBS 3 раза по 10 мин, постфиксировали в 1% растворе OsO₄ на PBS в течение 1 часа и вновь промывали. Затем образцы обезвоживали в растворе спиртов в возрастающих концентрациях, смеси спирта с ацетоном и ацетоне. Далее образцы ткани заключали в смесь

смола эпона с аралдитом (Sigma – Aldrich, США). В заключение смолу полимеризовали в течение 2х суток, повышая температуру от 35° до 60 °С. Из блоков с образцами кишечника на ультратоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия) изготавливали ультратонкие срезы, снимали их на сетки с коллодиевой пленкой и контрастировали их по 10 мин в растворе уранилацетата и в растворе цитрата свинца. Подготовленные таким образом срезы изучали под электронным микроскопом Jeol JEM-2100 и Jeol JEM-1400 (JEOL Ltd, Япония).

Статистический анализ

Статистический анализ был выполнен в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). Проверку данных на соответствие нормальному распределению осуществляли с применением критерия Шапиро-Уилка. Данный тест показал, что все параметры оценки поведения не имеют нормального распределения, поэтому для дальнейшего анализа применяли непараметрический тест парных сравнений Манна-Уитни. Данные представлены в виде медианы с перценталями (25; 75).

Для сравнения морфологических данных применяли непарный t-тест. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего (M ± SEM). Значимыми считали различия между группами при p < 0,05.

Для сравнения морфологических данных применяли непарный t-тест. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего (M ± SEM). Значимыми считали различия между группами при p < 0,05.

Результаты исследования

Оценка поведения в тесте «Открытое поле»

В тесте «Открытое поле» крысы, пережившие стресс, демонстрировали поведение, отличное от контрольных крыс по ряду показателей (табл. 1). Стрессированные крысы, перемещались с повышенной скоростью и проходили за первую минуту

в 1.5 раза большее расстояние, чем крысы контрольной группы. У крыс, переживших стресс, было меньше время, затрачиваемое на акт «обнюхивание» (p=0,04), но увеличивалась длительность акта «груминг», отмечалась тенденция к увеличению

Таблица 1.

Показатели поведения самцов крыс в тесте «Открытое поле»

Обозначения:

N – количество актов; T – суммарная длительность акта, с; T_{cp} – средняя длительность обследования норки. Данные представлены в виде медианы с перцентилями (25;75)

Table 1.

Behavioral measures of male rats in the Open Field test

Designations:

N – number of acts; T – total act duration, s; T_{avg} – average burrow investigation time. Data are presented as median with percentiles (25;75)

Параметр	Группа		P (Тест Манна-Уитни)	
	Контрольная (n=14)	Стресс (n=14)		
Дистанция за первую мин., м	3.76 (2,74; 4,80)	5.66 (4,29; 6,36)	0.033	
Дистанция, м	8.21 (5,99; 10,84)	11.07 (8,77; 14,03)	0.068	
Скорость локомоции, см/с	6.68 (5,51; 7,49)	9.23 (7,85; 9,96)	0.0014	
Суммарная длительность акта «обнюхивание», с	54.38 (39.98; 65.43)	34.85 (29.86; 43.50)	0.023	
Акт «норка»	N	4.00 (3,00; 8,00)	5.00 (3,00; 8,00)	0.90
	T	9.36 (7.22; 19.10)	13.02 (6.24; 17.77)	0.38
	T_{cp}	1.81 (1.32; 2.34)	2.62 (1.56; 3.64)	0.065
Суммарная длительность акта «груминг», с	14.11 (4.94; 28.72)	34.85 (29.87; 43.50)	0.016	
Время в периферийной зоне,%	92.60 (85.72; 94.39)	93.20 (86.78; 96.20)	0.56	
Время в центральной зоне,%	7.40 (3.48; 12.54)	6.80 (3.80; 13.22)	0.78	

среднего времени обследования норки ($p = 0,065$). 36% крыс, переживших витальный стресс, проявляли сниженную активность (сидели неподвижно более двух третей времени теста), и в структуре их поведения отсутствовала вертикальная активность и акт «груминг».

Оценка морфологических изменений в кишечнике

Методами обзорных окрасок выраженных деструктивных морфологических изменений, таких как эрозии и язвы, в слизистой оболочке кишечника обнаружено не было. В отдельных случаях наблюдалось разрушение единичных клеток апикальной части ворсинок тонкой кишки в группе «стресс».

При окрашивания исследуемых образцов альциановым синим было определено, что длина ворсинок тонкой кишки крыс из группы «стресс» была больше, чем у контрольных крыс, соответственно: $897,40 \pm 28,86$ мкм vs $731,30 \pm 36,15$ мкм ($p < 0,01$) (рис. 1с). Глубина крипт в тонкой кишке и толстой кишке у крыс, переживших стресс, также увеличивалась по сравнению с контрольными крысами, однако различия достигли статистической значимости только в толстой кишке: $372,40 \pm 17,24$ мкм в группе С vs $320,30 \pm 9,68$ мкм в группе К ($p = 0,03$) (рис. 1г).

Оценка ультраструктурных изменений в кишечнике

Ультраструктуру клеток кишечного эпителия исследовали методом электронной микроскопии. В образцах тонкой и толстой кишки крыс, не подвергавшихся стрессу, энтероциты и колоноциты имели типичное строение (рис. 2а и с): микроворсинки составляли сплошной слой, цитоплазма была заполнена органеллами, включая митохондрии с плотно упакованными кристами.

У крыс, подвергшихся стрессу, на 18-й день в эпителиоцитах тонкой (рис. 2b) и толстой (рис. 2d) кишки отмечалась деградация микроворсинок, они набухали и фрагментировались. В части эпителиальных клеток тонкой кишки цитоплазма и митохондрии сохраняли свою структуру, но встречалось много энтероцитов,

Таким образом, крысы, пережившие однократный витальный стресс, на 16-й день демонстрировали признаки эмоционального напряжения и тревожности, характерные для посттравматического стрессового расстройства (ПТСР).

Количество бокаловидных клеток в ворсинках тонкой кишки было сопоставимым в обеих группах, при этом в криптах тонкой кишки их количество было увеличено в группе «стресс» по сравнению с контрольной группой, соответственно: $50,09 \pm 1,93$ vs $44,06 \pm 1,61$ ($p = 0,04$) (рис. 1d). В криптах толстой кишки статистически значимых различий между группами не обнаружено, хотя отмечалась тенденция к уменьшению их количества у крыс, переживших стресс.

Напротив, количество клеток, иммунопозитивных к фосфорилированному гистону H3, в криптах тонкой кишки было меньше, чем у крыс контрольной группы, соответственно: $80,04 \pm 10,14$ vs $161,80 \pm 14,82$ ($p < 0,01$) (рис. 1j). В криптах толстой кишки достоверных различий в численности таких клеток не наблюдалось.

содержащих в цитоплазме набухшие митохондрии, митохондрии с полостями между кристами или полностью разрушенные митохондрии без крист (рис. 2b).

На этом сроке после стресса в колоноцитах толстой кишки также отмечалось набухание цитоплазмы, а митохондрии были разрушены, кристы в них отсутствовали (рис. 2d).

В просвете и криптах тонкой и толстой кишки крыс присутствовали многочисленные бактерии (рис. 3a). У крыс, переживших стресс, на участках кишечного эпителия, лишенных микроворсинок, нередко бактерии контактировали с апикальной мембраной эпителиоцитов (рис. 3b). В месте контакта бактерий отмечалась конденсация актина

Рисунок 2. Постстрессовые изменения ультраструктуры кишечных эпителиоцитов

Обозначения: a, b – тонкая кишка; c, d – толстая кишка; a, c – контроль; b, d – после стресса; стрелками (↓) показаны микроворсинки, звездочками (*) – нормальные митохондрии; (*) – поврежденные митохондрии; масштабная линейка фото – 1 мкм.

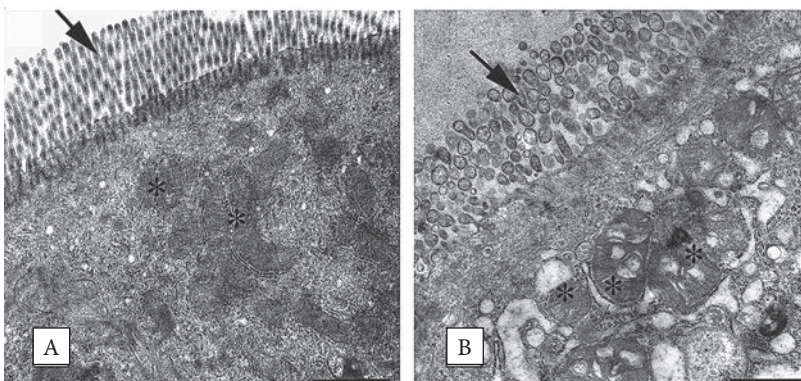


Figure 2. Post-stress ultrastructural changes in intestinal epithelial cells.

Designations: a, b – small intestine; c, d – large intestine; a, c – control; b, d – post-stress; arrows (↓) indicate microvilli; asterisks (*) show: normal mitochondria (*); damaged mitochondria (*). Scale bar: 1 μm.

Рисунок 3. Бактерии в просвете кишки (a) и бактерия, контактирующая с мембраной эпителиоцита (b)

Обозначения: белыми звездочками (*) отмечены бактерии, стрелкой (↓) – микроворсинки; наконечник стрелки (▼) – место конденсации актина терминальной сети; масштабная линейка: 1 мкм (a); 500 нм (b)

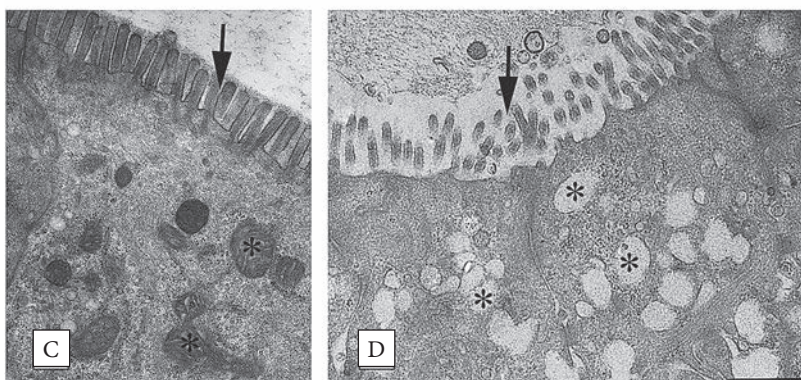
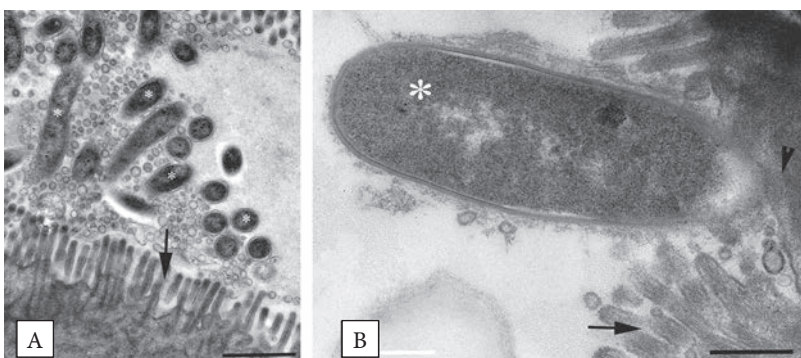


Figure 3. Bacteria in the intestinal lumen (a) and bacterium contacting epithelial cell membrane (b).

Designations: white asterisks (*) – bacteria; arrow (↓) – microvilli; arrow-head (▼) – site of terminal web actin condensation. Scale bar: 1 μm (a); 500 nm (b).



терминальной сети, и образовывался так называемый «пьедестал», характерный для начальной стадии проникновения бактерии в клетку.

Таким образом, при сохранной в целом макроструктуре эпителия тонкой и толстой кишки

у крыс, переживших витальный стресс, на 18 день отмечались ультраструктурные нарушения, что способствовало контакту кишечных бактерий с эпителиоцитами и транслокации бактерий из просвета кишки в эпителиальный пласт и далее.

Обсуждение результатов

В данном исследовании изучена морфологическая структура кишечного тракта при проявлениях ПТСР у взрослых крыс после однократного эпизода стресса угрозы жизни. Данная модель хорошо изучена и охарактеризована с точки зрения поведения, липидного обмена, и деструктивных процессов в мозге [16, 23], однако наблюдаемые при этом изменения в морфологии кишечного эпителия показаны впервые.

Наличие признаков ПТСР у крыс на 16-й день после стресса подтверждено выявленными изменениями поведения в тесте «Открытое поле». При помещении в незнакомое новое пространство крысы

демонстрировали эмоциональное возбуждение, что сказывалось на более быстром перемещении, особенно в первую минуту теста, поиском убежища, увеличением времени груминга. Данные поведенческие характеристики отражают высокий уровень тревожности [24, 25], а уменьшение длительности акта «обнюхивание» может свидетельствовать о снижении исследовательского поведения, повышенной тревожности и изменении оценки риска [26].

Изменения поведения у крыс после 15 дня стрессового воздействия уже не являются острой реакцией на стресс и могут свидетельствовать, что

ситуативная тревожность перешла в фазу антиципаторной тревожности, то есть отражает наличие у животных посттравматического стрессового расстройства.

Тревога является естественным адаптационным механизмом, сигнализируя о возможных угрожающих изменениях во внешнем мире или в самом организме [3]. Она характеризуется вегетативной и нейроэндокринной активацией, психомоторным возбуждением, а также специфическими поведенческими паттернами [11]. Однако, патологическая тревога может лежать в основе различных постстрессовых расстройств и нарушений деятельности ЖКТ. В свете современных представлений об оси «кишечник – мозг» встает вопрос о причинно-следственных отношениях.

Факт о возможном возникновении язв в желудочно-кишечном тракте при хроническом стрессе хорошо известен [27, 28]. В наших исследованиях, на 18 день после однократного стресса угрозы жизни в пищеварительном тракте крыс не было обнаружено выраженных деструктивных изменений в виде эрозий или язв, однако, наблюдались морфофункциональные изменения – увеличение длины ворсинок тонкой кишки и глубины крипт толстой кишки, снижение пролиферации и увеличение числа бокаловидных клеток в криптах тонкой кишки.

В большинстве работ после стрессорного воздействия отмечается укорачивание ворсинок [29, 30, 31], что может приводить к негативным последствиям, поскольку снижается площадь абсорбционной поверхности кишечника. В связи с этим, наблюдаемое увеличение длины ворсинок тонкой кишки после однократного стресса угрозы жизни может являться компенсаторной реакцией на гипоксию, возникающую после действия витального стресса из-за разрушения митохондрий в кишечном эпителии. Увеличение длины ворсинок, например, наблюдается в условиях гипоксии, вызванной диетой, богатой фруктозой [32].

В других исследованиях однократный психоэмоциональный стресс приводил к кратковременным изменениям длины ворсинок, которые возвращались к исходным параметрам уже через 14 дней [30]. Данное исследование показывает, что при сильном психоэмоциональном стрессе, каким является стресс угрозы жизни, эти изменения могут быть более длительными и свидетельствуют об устоявшихся патологических изменениях.

Известно, что при хроническом стрессе подавляется пролиферация стволовых клеток в тонком кишечнике, что может нарушать процессы

обновления эпителия, снижать его барьерную функцию и способствовать развитию патологий [33]. Нами выявлено уменьшение числа клеток, позитивных к фосфорилированному гистону H3 (ФГН3) после однократного эпизода витального стресса в кишечнике крыс, что свидетельствует о снижении пролиферативной активности кишечного эпителия. Выявленное при этом увеличение глубины крипт является компенсаторным механизмом, направленным на восстановление эпителия, что согласуется с данными литературы [34].

Обычно при стрессе наблюдается увеличение числа бокаловидных клеток, а также продуцируемой ими слизи, что связывают с активацией защитных функций для предотвращения проникновения патогенов в эпителиальный пласт [35]. Мы также наблюдали увеличение количества бокаловидных клеток в криптах тонкой кишки, но без изменения их количества в удлинённых ворсинках. Вероятно, такая локализация бокаловидных клеток отражает нарушение их созревания и миграции. Так, в модели раннего постнатального стресса у поросят отмечалось накопление незрелых эпителиальных клеток и ускоренное образование бокаловидных клеток, которые преимущественно секретируют нейтральные муцины, обладающие меньшей ферментативной активностью и устойчивостью к ферментативному расщеплению. Такие изменения приводили к ослаблению барьерной функции кишечника, повышали его проницаемость, что сопровождалось диареей и задержкой роста [36]. В нашем исследовании показано, что кишечные бактерии преодолевают слой слизи и контактируют с поверхностью эпителиоцитов.

Наблюдаемые ультраструктурные нарушения в энтероцитах и колоноцитах и обнаруженные транслоцирующиеся в эпителиальный пласт бактерии могут свидетельствовать о нарушении барьерной функции кишечника, что может приводить к воспалительным процессам, лежащим в основе патологии не только ЖКТ, но и постстрессовых расстройств.

Таким образом, однократный витальный стресс приводит к долговременным изменениям, затрагивающим слизистую оболочку пищеварительного тракта, включая увеличение длины ворсинок, глубины крипт, снижение пролиферативной активности, разрушение митохондрий, транслокацию бактерий, что указывает на необходимость разработки средств для защиты кишечного барьера при постстрессовых расстройствах.

Заключение

Результаты настоящего исследования показали, что однократный витальный стресс оказывает отдалённое влияние не только на поведение, но и на клеточную организацию слизистой оболочки пищеварительного тракта. На 16-й день после стрессового эпизода у крыс сохранялись выраженные проявления тревожности и изменённые поведенческие паттерны, характерные для посттравматического стрессового расстройства.

В пищеварительном тракте также наблюдались долговременные изменения, включающие увеличение длины ворсинок тонкой кишки, увеличение глубины крипт толстой кишки, а также повышение количества бокаловидных клеток в криптах тонкой кишки, что может отражать адаптивно-компенсаторный ответ, направленный на восстановление нарушенной барьерной функции кишечника. Выявленное снижение пролиферативной

активности эпителия (снижение экспрессии фосфорилированного гистона H3), а также признаки бактериальной транслокации указывают на нарушение баланса между регенерацией и повреждением, что потенциально снижает устойчивость слизистой оболочки пищеварительного тракта к повреждающим факторам. Подобные изменения в слизистой оболочке свидетельствует

о вовлечённости пищеварительного тракта в системный ответ на стресс. Нарушение целостности кишечного барьера может представлять одно из звеньев патогенеза посттравматических стрессовых расстройств, поэтому при лечении ПТСР необходимо дополнительно использовать средства, направленные на восстановление структуры и функции кишечного барьера.

Соблюдение этических стандартов

Проведенное исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 3/23 от 20.09.2023). Работу с животными выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.), Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотренным вариантом 2000 г. и с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986).

Источники финансирования

Работа выполнена по государственному заданию ФГБНУ «ИЭМ» в рамках ПНИ FGWG-2023–0004.

Funding Sources

This work was supported by a government contract from the Institute of Experimental Microbiology and Microbiology (IEM) under Project No. FGWG-2023–0004.

Благодарность

Авторы выражают благодарность Научно-ресурсному центру «Центр молекулярно-клеточных технологий» Санкт-Петербургского государственного университета (РНЦ МКТ СПбГУ), предоставившему оборудование для проведения электронно-микроскопических исследований.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the Research and Resource Center «Center for Molecular and Cellular Technologies» of St. Petersburg State University (RRC MKT SPbU), which provided the equipment for electron microscopy studies.

Литература | References

- Glynn H., Möller S.P., Wilding H., Apputhurai P., Moore G., Knowles S.R. Prevalence and Impact of Post-traumatic Stress Disorder in Gastrointestinal Conditions: A Systematic Review. *Dig Dis Sci.* 2021; 66(12):4109–4119. doi: 10.1007/s10620-020-06798-y.
- Appleton J. The Gut-Brain Axis: Influence of Microbiota on Mood and Mental Health. *Integr Med (Encinitas)*. 2018; 17(4):28–32.
- Margolis K.G., Cryan J.F., Mayer E.A. The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood. *Gastroenterology*. 2021; 160(5):1486–1501. doi: 10.1053/j.gastro.2020.10.066.
- Khalturina E.O., Klueva L.A., Boshyan R.E., Zembatov G.M., Alimova A.M. Gut Microbiome in Stress-related Disorders: The New Approaches to Neuroinflammation syndrome. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021; 196(12): 74–82. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-196-12-74-82.
Халтурина Е.О., Ключева Л.А., Бошнян Р.Е., Зембатов Г.М., Алимова А.М. Микробиом кишечника при стресс-индуцированных расстройствах: новый взгляд на синдром нейровоспаления. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021;196(12): 74–82. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-196-12-74-82.
- Nagpal R., Yadav H. Bacterial Translocation from the Gut to the Distant Organs: An Overview. *Ann Nutr Metab.* 2017; 71(1):11–16. doi: 10.1159/000479918.
- Zheng P.Y., Feng B.S., Oluwole C., Struiksma S., Chen X., Li P., Tang S.G., Yang P.C. Psychological stress induces eosinophils to produce corticotrophin releasing hormone in the intestine. *Gut.* 2009; 58(11):1473–1479. doi: 10.1136/gut.2009.181701.
- Stakenborg N., Viola M.F., Boeckxstaens G.E. Intestinal neuro-immune interactions: focus on macrophages, mast cells and innate lymphoid cells. *Curr Opin Neurobiol.* 2020; 62: 68–75. doi: 10.1016/j.conb.2019.11.020.
- Kelly J.R., Kennedy P.J., Cryan J.F., Dinan T.G., Clarke G., Hyland N.P. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci.* 2015; 9:392. doi: 10.3389/fncel.2015.00392.
- Foster J.A., Rinaman L., Cryan J.F. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiol Stress.* 2017; 7:124–136. doi: 10.1016/j.ynstr.2017.03.001.
- Ensari A., Marsh M.N. Exploring the villus. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2018; 11(3):181–190.
- Keskin G. Approach to stress endocrine response: somatization in the context of gastroenterological symptoms: a systematic review. *Afr Health Sci.* 2019; 19(3): 2537–2545. doi: 10.4314/ahs.v19i3.29.
- Li Y., Wan H., Ma R., Liu T., Chen Y., Dong Y. Chronic Stress That Changed Intestinal Permeability and Induced Inflammation Was Restored by Estrogen. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24:12822. doi: 10.3390/ijms241612822.
- Leigh S.J., Uhlig F., Wilmes L. et al. The impact of acute and chronic stress on gastrointestinal physiology and function: a microbiota-gut-brain axis perspective. *J Physiol.* 2023; 601(20):4491–4538. doi: 10.3390/10.1113/JP281951.
- Wei W., Liu Y., Hou Y. et al. Psychological stress-induced microbial metabolite indole-3-acetate disrupts intestinal cell lineage commitment. *Cell Metab.* 2024; 36(3):466–483.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2023.12.026.

15. Tsikunov S.G., Pshenichnaya A.G., Klyueva N.N., Vinogradova T.V., Denisenko A.D. Vital stress causes long-lasting behavioral disorders and lipid metabolism deviations in female rats. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2016; 14 (4):32–41 (In Russ.) doi: 10.17816/RCF14432–41.
- Цикунов С.Г., Пшеничная А.Г., Ключева Н.Н., Виноградова Т.В., Денисенко А.Д. Витальный стресс вызывает длительные расстройства поведения и обмена липидов у самок крыс. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2016; 14(4):32–41. doi: 10.17816/RCF14432–41.
16. Tsikunov S.G., Pyatibrat E.D., Gordienko A.V. et al. Specific changes in lipid spectrum during long-term period after vital stress in animal experiments and humans. *Vestnik of Saint Petersburg University*. 2012; Series 11: Medicine 2:155–160. (In Russ.) doi: 10.1111/ppc.12362.
- Цикунов С.Г., Пятибрат Е.Д., Гордиенко А.В. и др. Особенности изменения спектра липидов в отдаленном периоде витального стресса в эксперименте на животных и у людей. *Вестник СПбГУ*. 2012. Серия 11: Медицина 2: 155–160. doi: 10.1111/ppc.12362.
17. Sanchis-Ollé M., Belda X., Gagliano H., Visa J., Nadal R., Armario A. Animal models of PTSD: Comparison of the neuroendocrine and behavioral sequelae of immobilization and a modified single prolonged stress procedure that includes immobilization. *J Psychiatr Res*. 2023; 160:195–203. doi: 10.1016/j.jpsychires.2023.02.020.
18. Zhang L., Deng L., Ma C., Zhang H., Dang Y. Brain-Derived Neurotrophic Factor Delivered Intranasally Relieves Post-Traumatic Stress Disorder Symptoms Caused by a Single Prolonged Stress in Rats. *Neuropsychobiology*. 2023; 82(1):40–50. doi: 10.1159/000528755.
19. Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review). *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2018; 10(2): 156–165. doi: 10.17691/stm2018.10.2.19.
20. Korzhevskiy D.E., Kirik O.V., Beznin G.V. Method of selective demonstration of proliferating cells in the structures of developing nervous system based on the detection of phosphorylated H3 histone. *Morphology*. 2012; 142 (6):69–72. (In Russ.) doi: 10.17816/morph.399626.
- Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Безнин Г.В. Метод селективного выявления пролиферирующих клеток в структурах формирующейся нервной системы, основанный на определении фосфорилированного гистона H3. *Морфология*. 2012; 142 (6):69–72. doi: 10.17816/morph.399626.
21. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*. 2012; 9(7):676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
22. Hajibagheri M.A. Preparation of double/single-stranded DNA and RNA molecules for electron microscopy. *Methods Mol Biol*. 1999; 117:209–227. doi: 10.1385/1-59259-201-5:209.
23. Tsikunov S.G., Makarova T.M., Kusov A.G., Shabaev V.V. [The Effect of “Pure” Psychogenic Trauma on the Structure of Emotional Behavior in Rats]. *Current Issues in Fundamental Research in Biology and Medicine*. *Saint Petersburg: Nauka*. 2000; 184–185. (In Russ.)
- Цикунов С.Г., Макарова Т.М., Кусов А.Г., Шабаяев В.В. Влияние «чистой» психогенной травмы на структуру эмоционального поведения крыс. *Актуальные проблемы фундаментальных исследований в области биологии и медицины*. СПб.: Наука. 2000; 184–185.
24. Chen L.J., Shen B.Q., Liu D.D., Li S.T. The effects of early-life predator stress on anxiety- and depression-like behaviors of adult rats. *Neural Plast*. 2014:163908. doi: 10.1155/2014/163908.
25. Campos A.C., Fogaça M.V., Aguiar D.C., Guimarães F.S. Animal models of anxiety disorders and stress. *Braz J Psychiatry*. 2013; 35(2): S101–S111. doi: 10.1590/1516-4446-2013-1139.
26. Sestakova N., Puzserova A., Kluknavsky M., Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdiscip Toxicol*. 2013; 6(3):126–135. doi: 10.2478/intox-2013-0020.
27. Takeuchi K., Furukawa O., Okabe S. Induction of duodenal ulcers in rats under water-immersion stress conditions. Influence of stress on gastric acid and duodenal alkaline secretion. *Gastroenterology*. 1986; 91(3):554–63. doi: 10.1016/0016-5085(86)90622-0.
28. Tarasova T.V., Mosina L.M., Tarasov R.S. et al. Changes in the lipid balance in the gastric mucosa in rats under acute stress. *Morphology*. 2024; 162 (2):154–163. (In Russ.) doi: 10.17816/morph.628983.
- Тарасова Т.В., Мосина Л.М., Тарасов Р.С. и др. Изменение липидного баланса в слизистой оболочке желудка у крыс при остром стрессе. *Морфология*. 2024; 162 (2):154–163. doi: 10.17816/morph.628983.
29. Leigh S.J., Uhlig F., Wilmes L. et al. The impact of acute and chronic stress on gastrointestinal physiology and function: a microbiota-gut-brain axis perspective. *J Physiol*. 2023; 601(20):4491–4538. doi: 10.1113/JP281951.
30. Shah J., Deas S.B., Ren C., Jilling T., Brawner K.M., Martin C.A. The Effects of Gestational Psychological Stress on Neonatal Mouse Intestinal Development. *J Surg Res*. 2019; 235:621–628. doi: 10.1016/j.jss.2018.10.054.
31. Zhang Y., Duan C., Wu S. et al. Knockout of IL-6 mitigates cold water-immersion restraint stress-induced intestinal epithelial injury and apoptosis. *Front Immunol*. 2022; 13:936689. doi: 10.3389/fimmu.2022.936689.
32. Taylor S.R., Ramsamooj S., Liang R.J., Katti A., Pozovskiy R., Vasan N., Hwang S.K., Nahiyaan N., Francoeur N.J. et al. Dietary fructose improves intestinal cell survival and nutrient absorption. *Nature*. 2021; 597(7875):263–267. doi: 10.1038/s41586-021-03827-2.
33. Bai X. A55 Chronic stress impairs the intestinal cryptal stem cell cycle and paneth cell proliferation. *Journal of the Canadian Association of Gastroenterology*. 2025; 8(1): i22-i23. doi: 10.1093/jcag/gwae059.055.
34. Zhang Y., Duan C., Wu S. et al. Knockout of IL-6 mitigates cold water-immersion restraint stress-induced intestinal epithelial injury and apoptosis. *Front Immunol*. 2022; 13:936689. doi: 10.3389/fimmu.2022.936689.
35. Palomar M.M., Bru E., Maldonado Galdeano C., Perdigon G. Oral probiotics supplementation can stimulate the immune system in a stress process. *Journal of Nutrition and Intermediary Metabolism*. 2017; 8:29–40. doi: 10.1016/j.jnim.2017.06.001.
36. Chen X., Yang Z., Hu H. et al. Differentiation and Proliferation of Intestinal Stem Cells and its Underlying Regulated Mechanisms during Weaning. *Curr Protein Pept Sci*. 2019; 20(7):690–695. doi: 10.2174/1389203720666190125101834.

К статье

Морфофункциональные изменения слизистой оболочки пищеварительного тракта крыс в модели посттравматического стрессового расстройства (стр. 177–185)

To article

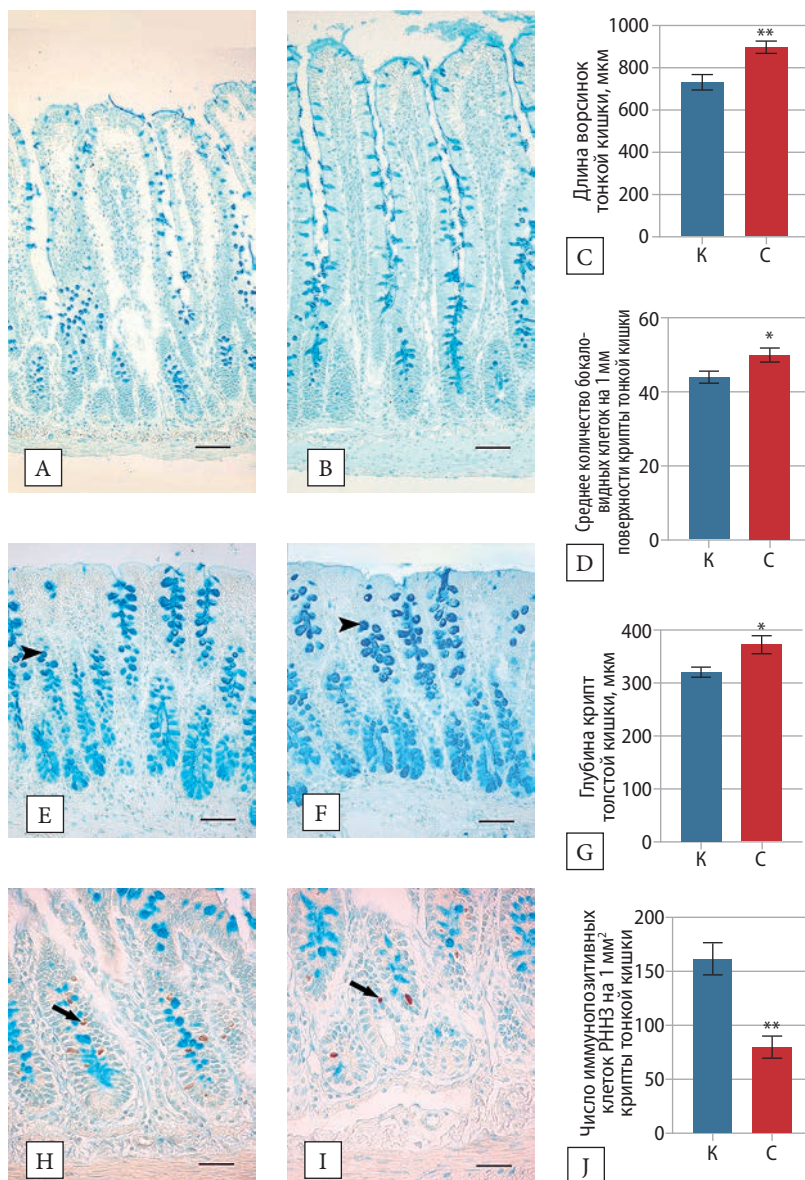
Structural and functional alterations in the gastrointestinal mucosa of rats in a PTSD model (p. 177–185)

Рисунок 1.

Фрагменты тонкой (a-b, h-i) и толстой (e-f) кишки крыс в группе контроля (a, e, h) и в группе витального стресса (b, f, i) и морфометрический анализ длины ворсинок тонкой кишки (c); количества бокаловидных клеток на 1 мм поверхности ворсинки тонкой кишки (d); глубины крипт толстой кишки (g); числа иммунопозитивных клеток ФГНЗ на 1 мм² крипты тонкой кишки (j).

Figure 1.

Fragments of rat small intestine (a-b, h-i) and large intestine (e-f) in control group (a, e, h) and life-threatening stress group (b, f, i), with morphometric analysis of: small intestine villus length (c); number of goblet cells per 1 mm villus surface (d); large intestine crypt depth (g); number of pHH3-immunopositive cells per 1 mm² crypt area (j).



Обозначения:

К – интактная группа; С – витальный стресс. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; наконечниками стрелок (►) показаны бокаловидные клетки; стрелками (↓) – иммунопозитивные клетки по фосфорилированному гистону H3; $n=5$ животных в каждой группе. Окраска: a-b, e-f – альтиановый синий; h-i – иммуногистохимическая окраска на фосфорилированный гистон H3 с подкраской альтиановым синим. Объектив: a-b – $20\times/0,40$; e-f – $40\times/0,65$; h-i – $60\times/0,80$. Масштабный отрезок равен 100 мкм (a-b), 50 мкм (e-f), 25 мкм (h-i).

Designations:

K – intact control group; C – life-threatening stress group. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; arrowhead (►) indicate goblet cells; arrows (↓) – pHH3-immunopositive cells; $n=5$ animals per group. Staining: a-b, e-f – Alcian blue; h-i – immunohistochemical staining for phosphorylated histone H3 with Alcian blue counterstain. Objective magnification: a-b – $20\times/0.40$; e-f – $40\times/0.65$; h-i – $60\times/0.80$. Scale bar: 100 μm (a-b), 50 μm (e-f), 25 μm (h-i).