

CHANGES IN THE DENSITY OF ASTROCYTES IN THE BRAIN OF  
RATS CAUSED BY A SINGLE PROLONGED STRESSPROMENE U GUSTINI ASTROCITA U MOZGU PACOVA  
USLOVLJENE POJEDINAČNIM PRODUŽENIM STRESOMSava Ivaz<sup>1</sup>, Tihomir Stojković<sup>2</sup>, Nataša Petronijević<sup>2</sup><sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija<sup>2</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Beograd, Srbija

Correspondence: savaivaz@yahoo.com

## Abstract

**Introduction:** Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a chronic syndrome caused by a traumatic stressful event. Numerous patients do not respond to conventional therapy, which shows that the pathogenetic mechanisms of PTSD are insufficiently known. It is associated with anxiety, memory impairment, increased fear, and loss of hippocampal volume. Few studies have examined the role of glial cells in PTSD, while recent findings suggest that astrocyte pathology may be a feature of the disorder. Single prolonged stress (PPS) is an animal model of PTSD consisting of mechanical restraint, forced swimming, and ether anesthesia until the tail reflex is lost.

**Aim:** To compare the density of astrocytes in the dentate gyrus, CA 1/2 and CA3 regions of the hippocampus and medial prefrontal cortex (mPFC) of the brains of rats exposed to SPS compared to the control group.

**Material and methods:** Wistar rats (n = 5) were exposed to PPS and sacrificed after 7 days in comparison with control animals (n = 5). The density of astrocytes was determined by immunohistochemical staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP). SSPS was used for statistical analysis.

**Results:** The density of GFAP+ astrocytes in the hippocampus of rats exposed to PPS was statistically significantly reduced compared to the control group in the CA1/2 (p < 0.01) and GD (p < 0.05) regions, while no significant difference was observed in the CA3 region. The density of GFAP+ astrocytes was statistically significantly lower in mPFC region of rat brains treated by SPS compared to the control group (p < 0.01).

**Conclusion:** The results indicate that SPS leads to a significant reduction in the density of astrocytes in the hippocampus and mPFC, which suggests that changes in astrocytes may play a role in the development of morphological and functional disorders triggered by PTSD. Understanding the role of astrocytes in PTSD may contribute to the development of new potential targets for the treatment of the disease.

## Keywords:

PTSD,  
astrocytes,  
GFAP,  
hippocampus,  
mPFC

## Sažetak

**Uvod:** Posttraumatski stresni poremećaj (PTSP) hronični je sindrom izazvan traumatskim događajem i nesposobnošću osobe da se oporavi od normalne negativne emocionalne reakcije na traumatski stres. Značajan broj pacijenata ne reaguje na standardnu terapiju, što ukazuje da je patofiziološki mehanizam ovog poremećaja nedovoljno istražen. Posttraumatski stresni poremećaj je povezan sa anksioznošću, oštećenjem pamćenja, pojačanim strahom i gubitkom volumena hipokampusa, ali je odnos između ovih promena ostao nepoznat. Malo studija je proučavalo ulogu glijalnih ćelija u PTSP-u, dok nedavni nalazi ukazuju da bi patologija astrocita mogla biti karakteristika ovog poremećaja. Jedan od animalnih modela PTSP-a je pojedinačni produženi stres (PPS), koji se sastoji od mehaničkog sputavanja, forsiranog plivanja i izlaganja životinje etarskoj anesteziji do gubitka refleksa repa.

**Cilj:** Cilj je uporediti gustinu astrocita u *gyrus dentatus*-u (GD), CA1/2 i CA3 regionima hipokampusa i medijalnom prefrontalnom korteksu (engl. *medial prefrontal cortex* - mPFC) mozga pacova izloženih PPS-u u odnosu na kontrolnu grupu.

**Materijal i metode:** U istraživanju su Vistar (*Wistar*) pacovi ( $n = 5$ ) bili izloženi PPS-u i žrtvovani nakon 7 dana, uporedo sa kontrolnim životinjama ( $n = 5$ ). Određivanje broja astrocita u datim regionima vršeno je imunohistohemijским bojenjem glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (engl. *glial fibrillary acidic protein* - GFAP). Statistička analiza je urađena korišćenjem statističkog programa SPSS (*IBM SPSS Statistics for Windows, v23.0*).

**Rezultati:** Gustina GFAP imunopozitivnih astrocita u hipokampusu pacova izloženih PPS-u je statistički značajno niža u odnosu na kontrolne životinje u CA1/2 ( $p < 0,01$ ) i GD ( $p < 0,05$ ) regionima, dok CA3 region nema zapaženih promena. Gustina GFAP imunopozitivnih astrocita bila je statistički značajno niža u mPFC-u mozga pacova izloženih PPS-u u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,01$ ).

**Zaključak:** Rezultati ovog istraživanja jasno ukazuju da PPS uzrokuje značajno smanjenje gustine astrocita u hipokampusu i mPFC-u, što govori u prilog tome da promene u astrocitima mogu imati ulogu u razvoju morfoloških i funkcionalnih poremećaja koje pokreće PTSP. Sagledavanje uloge astrocita u PTSP-u može doprineti razvoju savremenih terapijskih meta za lečenje ove bolesti.

### Ključne reči:

posttraumatski stresni poremećaj, astrociti, GFAP, hipokampus, medijalni prefrontalni korteks

## Uvod

Posttraumatski stresni poremećaj (PTSP) predstavlja hronični sindrom izazvan traumatskim događajem, kao i nesposobnošću osobe da se oporavi od normalne negativne emocionalne reakcije na traumatski stres. Trauma se može definisati kao emocionalni odgovor na zastrašujući ili uznemirujući događaj koji utiče na sposobnost osobe da se sa njim nosi i funkcioniše. Kod PTSP-a osoba koja je imala traumatski događaj razvija karakterističan skup simptoma koji se, prema 5. verziji Dijagnostičkog i statističkog vodiča (DSM-5), kategoriju u četiri grupe: intruziju, izbegavanje misli i ponašanja, negativne promene u mislima i raspoloženju i kognitivne promene (uzbuđenje i reaktivnost). Posttraumatski stresni poremećaj je povezan sa anksioznošću, oštećenjem pamćenja, pojačanim strahom i gubitkom volumena hipokampusa, ali je odnos između ovih promena za sada ostao nepoznat (1). Uzimajući u obzir visoku prevalenciju ovog onesposobljavajućeg oboljenja od 3,5%, koja donosi veliko finansijsko opterećenje zdravstvenim sistemima, značaj otkrivanja patofizioloških mehanizama i novih terapijskih modaliteta je ogroman (2).

Anksioznost i strah su fiziološka emocionalna stanja koja predstavljaju adaptivne funkcije i koja našoj vrsti pomažu da na efikasan način percipira i na odgovarajući način reaguje na znake koji signaliziraju opasnost, što je od

ključnog značaja za opstanak među vrstama. Traumatski stres ima višestruke efekte na fiziologiju i ponašanje ljudi i životinja. Ti efekti su u korelaciji sa disregulacijom hipotalamus-hipofiza-nadbubreg osovine, nekoliko sistema neurotransmitera, kao i sa strukturnim ili funkcionalnim promenama limbičkih struktura (3,4). Dosadašnji modeli ukazuju da značajnu ulogu u nastanku PTSP-a imaju amigdale, medijalni prefrontalni korteks (engl. *medial prefrontal cortex* - mPFC) i hipokampus (5). Prema ovom modelu, amigdale su hiperreaktivne, što dovodi do hiperpobudenosti, dok istovremeno hipofunkcija mPFC-a leži u osnovi smanjenja sposobnosti suzbijanja pažnje i odgovora na stimuluse povezane sa traumom. Konačno, smatra se da smanjena funkcija hipokampusa leži u osnovi oštećenja deklarativnog pamćenja i deficita u identifikovanju sigurnih konteksta kod PTSP-a (6). Neuroimidžing studijama je pokazano da kod osoba koje boluju od PTSP-a dolazi do smanjenja volumena hipokampusa (7).

Vrlo mali broj studija je proučavao ulogu glijalnih ćelija u PTSP-u, dok nedavni nalazi ukazuju da bi patologija astrocita mogla biti karakteristika ovog poremećaja (8). Astroцити su ćelije koje održavaju homeostazu centralnog nervnog sistema (CNS) i obavljaju zaštitnu ulogu (9). Zaduženi su za održavanje aktivnog miljea nervnog tkiva kroz mnogobrojne metaboličke procese, a učestvuju i u regulaciji sinaptičkog prenosa i plastičnosti neurona

(10). Zbog toga je doprinos astrocita patofiziologiji mnogih neuroloških bolesti posebno značajan. Novije studije pokazuju da su astrociti uključeni u formiranje i patološko remodelovanje sećanja na strah, kao i u poremećaje povezane sa stresom (11,12). U nedavnoj studiji na animalnom modelu pacova Sor i saradnici (*Saur et al.*) utvrdili su da PTSP menja morfologiju i smanjuje gustinu glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (engl. *glial fibrillary acidic protein* - GFAP), proteina citoskeleta astrocita pozitivnih hipokampalnih astrocita, dok nisu primetili da u amigdala dolazi do promena (13).

Animalni modeli PTSP-a imaju mnoge prednosti za istraživanje PTSP-a, pre svega jer izloženost traumatskom događaju može biti pod strogo kontrolisanim uslovima. Postoji više različitih animalnih modela PTSP-a, zasnovanih na aplikaciji stresora eksperimentalnoj životinji ili na pretpostavljenom patofiziološkom mehanizmu PTSP-a. Trenutno je najvalidniji model pojedinačni produženi stres (PPS) koji, pored bihevioralne alteracije, pokazuje i neuroendokrinološke karakteristike za PTSP (14). Ovaj model se sastoji iz aplikacije tri sukcesivna stresora: fizičkog sputavanja, forsiranog plivanja i etarske anestezije (15).

Cilj ovog istraživanja je određivanje promena u broju i gustini astrocita pomoću imunohistohemijskog bojenja GFAP u dentatnom girusu, CA1/2 i CA3 regionima hipokampusa i mPFC-u mozga pacova izloženih PPS-u u odnosu na kontrolnu grupu. Radna hipoteza je da je gustina GFAP imunopozitivnih astrocita u mozgu eksperimentalnih pacova izmenjena u odnosu na kontrolnu grupu.

## Materijal i metode

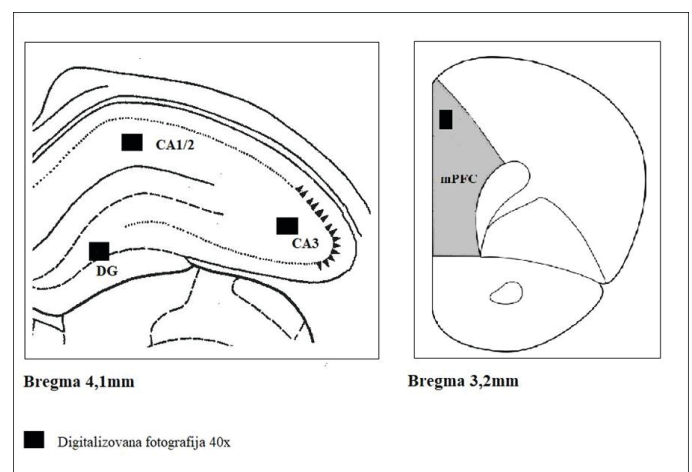
Za potrebe eksperimenta je korišćeno 10 mužjaka Vistar (*Wistar*) pacova, uzgajanih u Vivarijumu Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Životinje su bile stare 2 meseca, a prosečna telesna masa je iznosila 250 g. Životinje su gajene sa dvanaestočasovnim ciklusom svetlost–mrak (07-19h) na temperaturi od 22°C i vlažnošću vazduha 55%. Životinje su nasumično podeljene u dve grupe. Jednu grupu od 5 pacova činile su eksperimentalne jedinice nad kojima je izvršena procedura izlaganja PPS-u, dok je preostalih 5 životinja predstavljalo kontrolnu grupu i one su obitavale u svojim kavezima do žrtvovanja. Protokol ovog istraživanja je odobrio Etički komitet Univerziteta u Beogradu, broj rešenja 323-07-02608/2015-05/10.

Pacovi u eksperimentalnoj grupi bili su izloženi PPS-u po protokolu korišćenom u doktorskoj disertaciji dr Petrović (16). Eksperimentalna procedura je urađena u vremenu 9-13h u jednom danu i bila je sačinjena iz uzastopnog izlaganja životinja stresorima: fizičkom sputavanju, forsiranom plivanju i uvođenju u etarsku anesteziju (15). Stresiranje je započeto fizičkim sputavanjem u trajanju od 2h, gde su pacovi bili smešteni u specijalne plastične tube sa otvorom za nesmetano disanje i koje u potpunosti onemogućavaju njihovo kretanje. Nakon fizičkog sputavanja, svaka životinja je prebačena u plastični bazen (prečnik 250 mm, visina 550 mm) sa vodom temperature 24°C, gde je

bila prinuđena na plivanje u trajanju od 15 minuta. Nakon forsiranog plivanja je usledio period oporavljanja od 15 minuta na suvom, posle čega su životinje prenesene u stakleni eksikator gde su bile uvođene u inhalatornu etarsku anesteziju. Na dnu eksikatora je bila smeštena vata natopljena etrom (40 ml) sa kojom životinja nije bila u direktnom kontaktu. U eksikatoru je pacov boravio do gubljenja svesti (3-5 minuta). U trenutku kada životinja izgubi refleks repa bila je premeštena u svoj kavez u kome je obitavala do žrtvovanja. Preostalih 5 životinja iz kontrolne grupe nastavile su da obitavaju u kavezima bez ometanja narednih 7 dana. Žrtvovanje životinja je izvršeno nakon 7 dana od eksperimentalne procedure. Pacovi su najpre anestezirani supkutanom aplikacijom 3,6% hloral-hidrata i perfundirani 4% paraformaldehidom (250 ml). Nakon perfuzije su odvojene glave, a izolovani mozgovi su dehidrirani u rastvorima saharoze rastuće koncentracije od 10%, 20%, i 30% gde su stajali po 24h. Mozgovi su sečeni na kriokatu (*Leica* CM1950, Nemačka) na debljinu preseka od 40 μm, nakon čega su potopljeni u rastvor antifrizna na -20°C.

Neposredno pre izvođenja imunohistohemijskog protokola odabrani su preseci medijalnog prefrontalnog korteksa (približno Bregma 3,2 mm) i hipokampusa (približno Bregma 4,1 mm) za analizu (**slika 1**).

Endogena peroksidaza u tkivu je najpre blokirana 3% rastvorom vodonik-peroksida ( $H_2O_2$ ), nakon čega su preseci 1h inkubirani u normalnom kozjem serumu na sobnoj temperaturi kako bi se blokirala nespecifična mesta vezivanja antitela. Nakon toga je izvršena inkubacija preseka sa primarnim anti-GFAP antitelom (1:1000, zečje poliklonsko, *Waltham*, SAD) u trajanju od 24h na 4°C, a potom sa komplementarnim sekundarnim antitelom 1,5h. Za vizuelizaciju je upotrebljen komercijalni *Vacastein ABC Kit* (*Vector Laboratories*, UK), u kome su sadržani sekundarno antitelo konjugovano sa biotinom i avidin-biotin kompleks. Zatim su preseci 5 minuta inkubirani 3,3-diaminobenzidinom (DAB), hromogenim supstratom za peroksidazu rena (HRP), pri čemu dolazi do reakcije u kojoj se formira braon reakcioni proizvod na mestu prisustva ciljnog antigena. Između svakog od navedenih koraka uzorci su ispirani 3 puta po 5 minuta u rastvoru fosfatnog pufera



**Slika 1.** Shematski prikazani analizirani regioni hipokampusa i medijalnog prefrontalnog korteksa mozga pacova.

(PBS, pH = 7,3). Preseci su prebačeni i fiksirani na histološke pločice (*Menzel Braunschweig*, Nemačka). Nakon toga su uzorci na pločicama kontrastirani rastvorom hematoksilina, dehidrirani u serijski rastućim koncentracijama etanola (70%, 96%, 100%) i prosvetljeni u rastvoru ksilola, nakon čega su odmah zaštićeni pokrovnim staklom pomoću DPX-a (*Sigma-Aldrich*, Nemačka).

Fotografisanje obojenih preseka hipokampusa i mPFC-a izvršeno je na *Leica DM 4000 B LED* mikroskopu sa digitalnom kamerom *Leica DFC295 (Leica Application Suite, LAS, 4.4.0)* pomoću softverskog sistema na uveličanju 40x. Za ovu analizu su fotografisana po 3 vidna polja (uveličanje 40x) svakog ispitivanog regiona mozga (CA1/2, CA3, GD i mPFC), tako da je ukupno analizirano 12 fotografija po životinji. Na dobijenim digitalnim fotografijama izvršena je kvantitativna analiza tako što su brojane imunoreaktivne ćelije (astrociti) odgovarajućih stereoloških preseka hipokampusa i mPFC-a mozgova životinja. Vrednosti izbrojanih ćelija su izražene apsolutnim brojem astrocita u jednom vidnom polju na uveličanju 40x (površina vidnog polja 0,0480 mm<sup>2</sup>), na osnovu koga je izračunata gustina ćelija po 1 mm<sup>2</sup>. Brojani su astrociti koji se nalaze u okviru vidnog polja i presecaju gornju i/ili desnu ivicu kvadrata vidnog polja. U okviru ispitivanih moždanih regiona vršeno je upoređivanje stereoloških preseka mozgova eksperimentalne i kontrolne grupe životinja na podjednako rastojanju od Bregme.

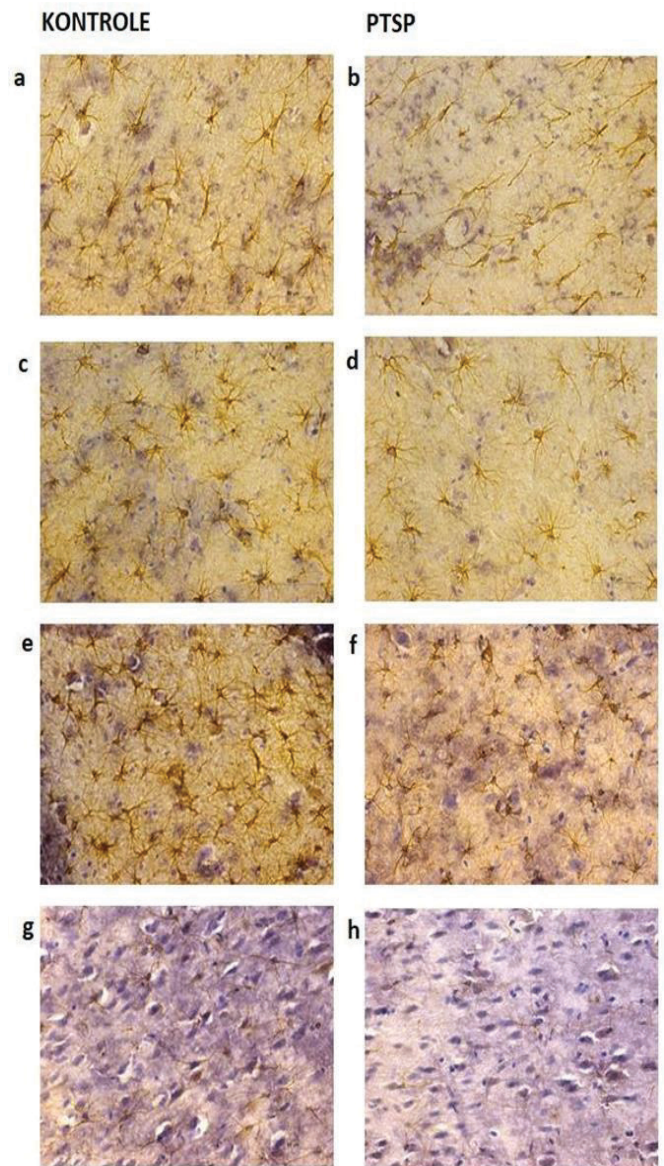
Statistička analiza je rađena upotrebom statističkog programa SPSS (*IBM SPSS Statistics for Windows*). Za utvrđivanje načina raspodele podataka korišćen je Kolmogorov Smirnov test. Studentov T-test za dva nezavisna uzorka je korišćen za upoređivanje gustine GFAP imunoreaktivnih astrocita eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu. Interval poverenja iznosio je 95% ( $\alpha = 0,05$ ), a statistička značajnost je utvrđena na  $p < 0,05$ .

## Rezultati

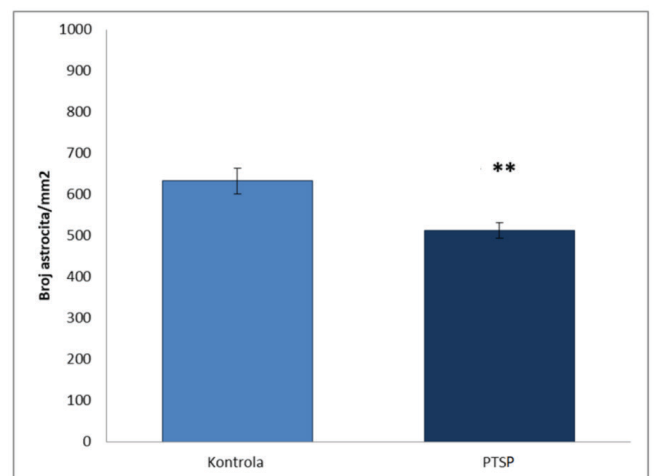
Gustina GFAP imunopozitivnih astrocita predstavljena je u obliku broja astrocita po 1 mm<sup>2</sup> preseka i prikazana je kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom. Gustina GFAP imunopozitivnih astrocita je statistički značajno niža u hipokampusu mozga pacova izloženih PPS-u u odnosu na kontrolnu grupu i to u CA1/2 regionu  $p < 0,01$  i u dentatnom girusu  $p < 0,05$ , dok u CA3 regionu nije zapažena statistički značajna razlika (**slika 2; grafikon 1-3**). Gustina GFAP imunopozitivnih astrocita je statistički značajno niža u mPFC-u mozga pacova izloženih PPS-u u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,01$ ) (**grafikon 4**).

## Diskusija

Rezultati ovog istraživanja nam jasno ukazuju na postojanje morfoloških promena hipokampusa i mPFC-a mozga u životinjskom modelu PTSP-a. Atrofija hipokampusa jeste jedna od najčešće uočenih morfoloških promena kod pacijenata sa PTSP, što potvrđuje više studija koje su pomoću magnetne rezonance procenjivale volumen

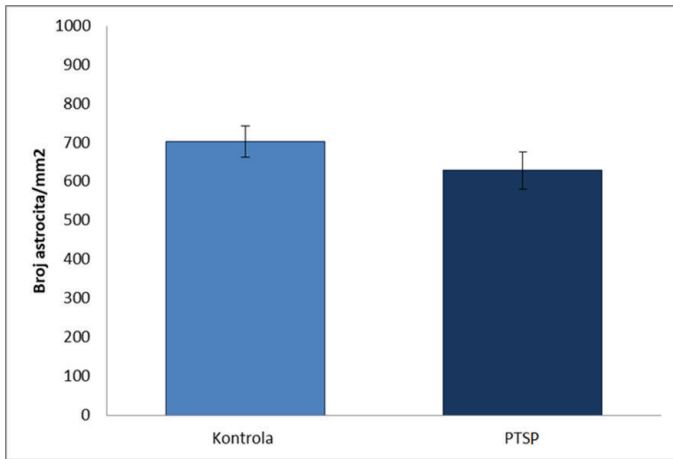


**Slika 2.** Digitalizovane reprezentativne fotografije moždanih struktura posle GFAP imunohistohemijskog bojenja: a, b) CA1/2 region hipokampusa; c, d) CA3 region hipokampusa; e, f) dentatni girus; g, h) mPFC.

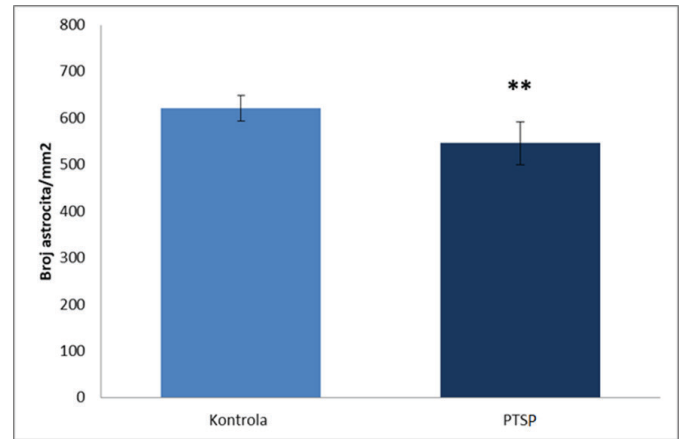


**Grafikon 1.** Gustina GFAP imunopozitivnih astrocita u CA1/2 regionu hipokampusa mozga kontrolnih pacova (n=5) i pacova izloženih pojedinačnom produženom stresu (n=5). Podaci prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD.

\*\*PTSP u odnosu na kontrole  $p < 0,01$  pacova.

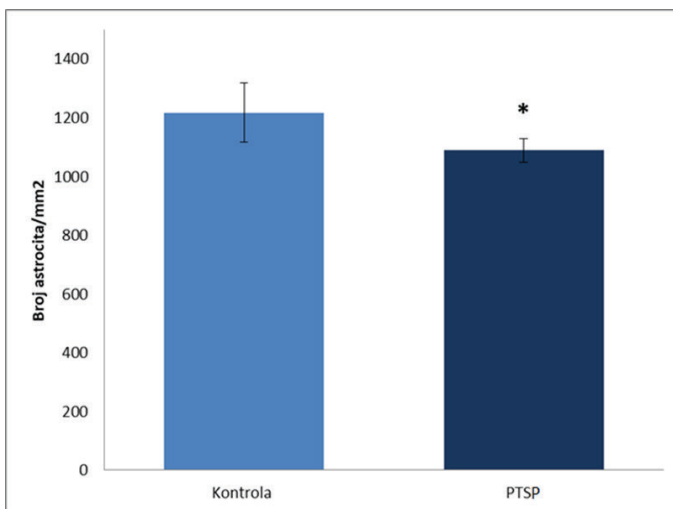


**Grafikon 2.** Gustina GFAP imunopozitivnih astrocita u CA3 regionu hipokampusa mozga kontrolne grupe pacova (n = 5) i pacova izloženih PPS-u (n = 5). Podaci prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD.



**Grafikon 4.** Gustina GFAP imunopozitivnih astrocita u mPFC-u mozga kontrolnih pacova (n = 5) i pacova izloženih pojedinačnom produženom stresu (n = 5). Podaci prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD.

\*\*PTSP u odnosu na kontrole p < 0,01.



**Grafikon 3.** Gustina GFAP imunopozitivnih astrocita u dentatnom girusu hipokampusa mozga kontrolnih pacova (n = 5) i pacova izloženih pojedinačnom produženom stresu (n = 5). Podaci prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD.

\*PTSP u odnosu na kontrole p < 0,05.

hipokampusa (17, 18). Imajući u vidu da astrociti predstavljaju veliku ćelijsku populaciju u hipokampusu, ova atrofija može biti, barem delimično, posledica gubitka astrocita uočenog u našem životinjskom modelu. Prethodne studije, koje su procenjivale astroglijalne promene u životinjskom modelu hroničnog stresa, pokazale su smanjenje od 25% GFAP pozitivnih ćelija u hipokampusu (19). Han i saradnici su primetili da PPS izaziva morfološke promene i neurona i glijalnih ćelija, odnosno astrocita, tako da su obe ćelijske populacije uključene u morfološke i funkcionalne promene hipokampusa (20).

Uloga astrocita u održavanju homeostaze centralnog nervnog sistema je višestruka. Deo su krvno-moždane barijere, dok posebno podržavaju i glimfatički sistem, koji je zadužen za uklanjanje metaboličkog otpada u mozgu (21). Obezbeđuju metaboličku podršku i regulišu lokalni protok krvi, kao i energetske bilans. Održavaju molekularnu homeostazu regulišući pH, koncentraciju jona i

neurotransmitera (glutamat, GABA, adenzin, monoamini). Oslabljena aktivnost astrocita u kontroli klirensa glutamata može dovesti do porasta njegove koncentracije u sinaptičkoj pukotini, kao i posledičnog ekscitotoksičnog oštećenja ćelija. Astrociti takođe sintetišu i oslobađaju mnoge neurotrofne faktore i faktore rasta, značajne za razvoj i funkcionisanje neurona, čija nedostupnost povećava ćelijsku ranjivost (21, 22). Pored svega, astrociti su dinamički regulatori sinaptogeneze, tako da njihove morfološke promene moraju imati uticaj i na funkcionalan odnos neuron-glija i komunikaciju neuron-neuron (23). Zanimljivo je da lečenje antidepresivima, kao što je fluoksetin, poboljšava raspoloženje i izaziva obnavljanje astroglije, što sugerise da je obnavljanje funkcije astrocita povezano sa promenama u ponašanju (24).

Hipokampus je važan region u limbičkom sistemu mozga koji reguliše kogniciju i pamćenje, posebno sećanje na strah (25). Hipokampalna formacija je sačinjena od zupčaste vijuge (*gyrus dentatus*) i hipokampusa u užem smislu (*hippocampus proper*) ili Amonovog roga, koji poseduje tri regiona, CA1, CA2 i CA3. Regioni CA1 i CA2 su ovde posmatrani kao jedan (CA1/2) zbog nejasne anatomske granice među njima i veoma male površine koju zauzima CA2 region. Region CA1/2 sadrži uglavnom piramidne ćelije i igra važnu ulogu u određivanju podudarnosti i usklađivanju informacija dobijenih iz CA3 regiona (26). Upravo u ovom regionu je došlo do najvećeg pada gustine astrocita. Iste nalaze su dobili Sor i saradnici (13), koji su primetili smanjenje gustine astrocita u *stratum radiatum*-u CA1 regiona hipokampusa, dok nisu primetili promene u amigdalama. Takođe su kod životinja podvrgnutih PPS-u uočili i morfološke promene u hipokampalnim astrocitima, u vidu smanjenja stepena grananja i broja primarnih nastavaka. Region CA3 ima vitalnu ulogu u "držanju pamćenja", tj. u privremenom memorisanju informacija (27). U ovom regionu u našem istraživanju jeste došlo do smanjenja gustine astrocita, ali to smanjenje nije statistički značajno. Ne postoje studije koje su određivale gustinu

astrocita u ovom regionu, što ostavlja potrebu za novim studijama. Zapaženo smanjenje gustine astrocita u dentatnom girusu je u skladu sa drugim studijama. Dentatni girus je duboka struktura okružena Amonovim rogom i igra ključnu ulogu u procesuiranju informacija od entorinalnog korteksa do CA3 regiona (28). Smatra se da je uključen u proces "razdvajanja uzoraka" kojim se dolazeći neuronski signali kodiraju različito jedan od drugog u vremenu kodiranja (29). Pretpostavka je da deficit razdvajanja informacija može biti u osnovi generalizacije straha koja se javlja kod poremećaja zasnovanih na anksioznosti i stresu, uključujući i PTSP (30). Osobe obolele od PTSP-a često navode širok spektar stimulusa koji im služi kao podsetnik traume i imaju poteškoće u razlikovanju novih i starih trauma (31).

Rezultati naše studije nam ukazuju na značajno smanjenje gustine astrocita i u mPFC-u. Ranije studije su pokazale da strukturne i funkcionalne promene ovog regiona mogu dovesti do smanjenja sposobnosti mPFC-a da reguliše amigdale, što dovodi do preteranog odgovora amigdala na stimulaciju strahom (32). U mnogim studijama magnetne rezonance (MRI) dokazano je smanjenje volumena mPFC-a i signala sive mase kod bolesnika sa dijagnozom PTSP-a, a pronađena je i značajna korelacija između zapremine mPFC-a sa težinom i simptomatologijom poremećaja (33, 34). U skoroj studiji Zeng i saradnici (*Zheng et al.*) (35) procenjivali su efekte pojedinačnog produženog stresa na neurone i astrocite mPFC-a i dobili da se intenzitet GFAP imunoreaktivnosti povećao 1 dan nakon PPS-a, a zatim se smanjio 4., 7. i 14. dana nakon PPS stimulacije, dok se broj neurona smanjuje od prvog dana. Ovi rezultati nam ukazuju da je disfunkcija mPFC-a važan faktor koji dovodi do poremećaja pamćenja i pamćenja straha kod ovih pacijenata. Jedan od osnovnih simptoma PTSP-a je i poremećaj spavanja (36). Nedavno je dokazano da PPS može da izazove akutne promene u trajanju spavanja, kao i kratkoročne i dugoročne promene u elektroencefalogramu (EEG) na animalnom modelu. Pokazana je hiperaktivacija neurona mPFC-a, kao i specifični poremećaji spavanja i buđenja (37). Mogući uzrok predstavlja upravo poremećeno metabolisanje neurotransmitera uzrokovano gubitkom astrocita.

## Zaključak

Rezultati ovog istraživanja jasno ukazuju da PPS dovodi do značajnog smanjenja gustine GFAP pozitivnih astroglijalnih ćelija u hipokampusu i medijalnom prefrontalnom korteksu, što podržava našu hipotezu. Ovaj rezultat nam ukazuje na značajnu ulogu astroglijalnih ćelija u morfološkim i funkcionalnim promenama ovih regiona mozga. Neophodna su dalja istraživanja na animalnim modelima i ljudima, koja posvećuju pažnju astrocitima, u cilju određivanja korelacije morfoloških promena astrocita sa simptomatologijom i težinom kliničke slike ovog poremećaja. Sagledavanje uticaja PPS procedure na morfološke promene astrocita u centralnom nervnom sistemu može pomoći razumevanju patofizioloških mehanizama nastanka

PTSP-a i doprineti razvoju savremenih terapijskih meta za lečenje ove bolesti.

## Literatura

- Schoenfeld TJ, Rhee D, Martin L, Smith JA, Sonti AN, Padmanaban V, et al. New neurons restore structural and behavioral abnormalities in a rat model of PTSD. *Hippocampus*. 2019; 29(9):848-61.
- Ballenger JC, Davidson JR, Lecrubier Y, Nutt DJ, Foa EB, Kessler RC, et al. Consensus statement on posttraumatic stress disorder from the International Consensus Group on Depression and Anxiety. *J Clin Psychiatry*. 2000; 61 Suppl 5:60-6.
- Bingham BC, Sheela Rani CS, Frazer A, Strong R, Morilak DA. Exogenous prenatal corticosterone exposure mimics the effects of prenatal stress on adult brain stress response systems and fear extinction behavior. *Psychoneuroendocrinology*. 2013; 38(11):2746-57.
- Sapolsky RM. Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem Res*. 2003; 28(11):1735-42.
- Hughes KC, Shin LM. Functional neuroimaging studies of post-traumatic stress disorder. *Expert Rev Neurother*. 2011; 11(2):275-85.
- Bremner JD, Randall P, Scott TM, Bronen RA, Seibyl JP, Southwick SM, et al. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*. 1995; 152(7):973-81.
- Stein MB, Koverola C, Hanna C, Torchia MG, McClarty B. Hippocampal volume in women victimized by childhood sexual abuse. *Psychol Med*. 1997; 27(4):951-9.
- Li B, Zhang D, Verkhatsky A. Astrocytes in Post-traumatic Stress Disorder. *Neurosci Bull*. 2022; 38(8):953-65.
- Semyanov A, Verkhatsky A. Astrocytic processes: from tripartite synapses to the active milieu. *Trends Neurosci*. 2021; 44(10):781-92.
- Verkhatsky A, Nedergaard M. Astroglial cradle in the life of the synapse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014; 369(1654):20130595.
- Li Y, Li L, Wu J, Zhu Z, Feng X, Qin L, et al. Activation of astrocytes in hippocampus decreases fear memory through adenosine A1 receptors. *Elife*. 2020; 9:e57155.
- Izquier I, Furini CR, Myskiw JC. Fear Memory. *Physiol Rev*. 2016; 96(2):695-750.
- Saur L, Baptista PP, Bagatini PB, Neves LT, de Oliveira RM, Vaz SP, et al. Experimental Post-traumatic Stress Disorder Decreases Astrocyte Density and Changes Astrocytic Polarity in the CA1 Hippocampus of Male Rats. *Neurochem Res*. 2016; 41(4):892-904.
- Yamamoto S, Morinobu S, Takei S, Fuchikami M, Matsuki A, Yamawaki S, et al. Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety*. 2009; 26(12):1110-7.
- Liberzon I, Krstov M, Young EA. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology*. 1997; 22(6):443-53.
- Petrović R. Morfološke i biohemijske promene u prefrontalnom korteksu, amigdaloidnom telu i hipokampalnoj formaciji mozga pacova uslovljene pojedinačnim produženim stresom. Beograd:Univerzitet u Beogradu; 2018.
- Kitayama N, Vaccarino V, Kutner M, Weiss P, Bremner JD. Magnetic resonance imaging (MRI) measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord*. 2005; 88(1):79-86.
- Lindauer RJ, Olf M, van Meijel EP, Carlier IV, Gersons BP. Cortisol, learning, memory, and attention in relation to smaller hippocampal volume in police officers with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*. 2006; 59(2):171-7.
- Czéh B, Simon M, Schmelting B, Hiemke C, Fuchs E. Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31(8):1616-26.

20. Han F, Xiao B, Wen L. Loss of Glial Cells of the Hippocampus in a Rat Model of Post-traumatic Stress Disorder. *Neurochem Res.* 2015; 40(5):942-51.
21. Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, et al. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science.* 2013; 342(6156):373-7.
22. Friedman WJ, Black IB, Kaplan DR. Distribution of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the postnatal rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience.* 1998; 84(1):101-14.
23. Kelley KW, Ben Haim L, Schirmer L, Tyzack GE, Tolman M, Miller JG, et al. Kir4.1-Dependent Astrocyte-Fast Motor Neuron Interactions Are Required for Peak Strength. *Neuron.* 2018; 98(2):306-319.e7.
24. Perez-urrutia N, Mendoza C, Alvarez-ricartes N, Oliveros-matus P, Echeverria F, Grizzell JA, et al. Intranasal cotinine improves memory, and reduces depressive-like behavior, and GFAP + cells loss induced by restraint stress in mice. *Exp Neurol.* 2017; 295:211–21.
25. Adami P, König P, Vetter Z, Hausmann A, Conca A. Post-traumatic stress disorder and amygdala-hippocampectomy. *Acta Psychiatr Scand.* 2006; 113(4):360-3; discussion 363-4.
26. Anand KS, Dhikav V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol.* 2012; 15(4):239-46.
27. Kerr KM, Agster KL, Furtak SC, Burwell RD. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus.* 2007; 17(9):697-708.
28. Ohm TG. The dentate gyrus in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res.* 2007; 163:723-40.
29. O'Reilly RC, McClelland JL. Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off. *Hippocampus.* 1994; 4(6):661-82.
30. Kheirbek MA, Klemenhagen KC, Sahay A, Hen R. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat Neurosci.* 2012; 15(12):1613-20.
31. Hayes JP, Hayes S, Miller DR, Lafleche G, Logue MW, Verfaellie M. Automated measurement of hippocampal subfields in PTSD: Evidence for smaller dentate gyrus volume. *J Psychiatr Res.* 2017; 95:247-52.
32. Harnett NG, Goodman AM, Knight DC. PTSD-related neuroimaging abnormalities in brain function, structure, and biochemistry. *Exp Neurol.* 2020; 330:113331.
33. Chen F, Ke J, Qi R, Xu Q, Zhong Y, Liu T, et al. Increased Inhibition of the Amygdala by the mPFC may Reflect a Resilience Factor in Post-traumatic Stress Disorder: A Resting-State fMRI Granger Causality Analysis. *Front Psychiatry.* 2018; 9:516.
34. Henigsberg N, Kalember P, Petrović ZK, Šečić A. Neuroimaging research in posttraumatic stress disorder - Focus on amygdala, hippocampus and prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2019; 90:37-42.
35. Zheng S, Wang H, Han F, Chu J, Zhang F, Zhang X, et al. Detection of Microstructural Medial Prefrontal Cortex Changes Using Magnetic Resonance Imaging Texture Analysis in a Post-Traumatic Stress Disorder Rat Model. *Front Psychiatry.* 2022; 13:805851.
36. Pawlyk AC, Morrison AR, Ross RJ, Brennan FX. Stress-induced changes in sleep in rodents: models and mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008; 32(1):99-117.
37. Lou T, Ma J, Wang Z, Terakoshi Y, Lee CY, Asher G, et al. Hyper-Activation of mPFC Underlies Specific Traumatic Stress-Induced Sleep-Wake EEG Disturbances. *Front Neurosci.* 2020; 14:883.