Туршилтын хулганад стрессийн (Social Defeat Stress) нөлөөгөөр үүссэн хооллолтын өөрчлөлтийг судалсан нь

А.Уянга, Т.Өлзийхүү, М.Мөнхзол, О.Зэсэмдорж

АШУҮИС, Био-Анагаахын сургууль, Эмгэг физиологийн тэнхим
Цахим шуудан: 2000uyanga@gmail.com, Утас: 88005187

Түлхүүр үг:

Social defeat
Нэмэх зам
Стресс
Глюкоз
C57BL/6J

Товч утга:

Үндэслэл: Таргалалт нь дэлхий нийтийг хамарсан нийгэм, эрүүл мэндийн тулгамдсан асуудал ба үүнд нөлөөлөх хүчин зүйлсийн нэг нь стресс юм. Стрессийн улмаас физиологийн зарим үзүүлэлт хэрхэн өөрчлөгдөж, таргалалт үүсгэж буйг судлах нь энэхүү судалгааг хийх үндэслэл боллоо. **Зорилго:** Стрессийн нөлөөгөөр туршилтын C57BL/6J хулганад гарсан хооллолтын өөрчлөлтийг судлан тогтоох **Арга, аргачлал**: C57BL/6J (бүлэг тус бүр n=4) болон BALB/C үүлдрийн (6 долоо хоногоос дээш) эр хулгануудыг ашиглав. Туршилтын хулгануудыг түрэмгийлэгч хулганаар 10 минутын хугацаанд түрэмгийлүүлсэн ба дараа нь гэрэл нэвтрэх нүхтэй, тунгалаг хавтангаар 90 минут тусгаарлаж, Social Defeat стресс үүсгэв. Туршилтын явцыг камераар бичиж, нэмэх замын (Elevated Plus Maze) сорилоор стрессийн түвшинг үнэлсэн. Хулганы сүүлний цусанд глюкозын агууламжыг тодорхойлж, идсэн хоолны хэмжээг тогтмол цагт, өдөр бүр хэмжсэн. **Үр дүн**: Нэмэх замын сорилоор архаг (274.35±44.08 сек) ба цочмог (220.76±15.81 сек) стресст өртсөн бүлгүүдийг хяналтын бүлэгтэй (180.48±15.44 сек) харьцуулахад хаалттай зам дээр удаан хугацааг өнгөрүүлэв ($p<0.05$). Стрессийн дараа архаг (9.67 ммоль/л) ба цочмог (8.9 ммоль/л) стресст өртсөн бүлгийг хяналтын бүлэгтэй (7.55±0.79 ммоль/л) харьцуулахад цусан дахь глюкозын хэмжээ статистик үнэн магадлал бүхий ($p<0.05$) ялгаатай өндөр байсан. Цочмог стресст өртсөн хулгануудын 48 цаг хүртэлх хугацаанд идсэн хоолны хэмжээ хяналтын бүлгээс бага байв ($p<0.05$). Харин архаг стресст өртсөн хулгануудын идсэн хоолны хэмжээ туршилтын 16 дахь өдөр статистик үнэн магадлалтайгаар ихэссэн байна ($p<0.05$). **Дүгнэлт**: Стрессийн нөлөөгөөр идэвхтэй хөдөлгөөн буурч байна. Цусны глюкозын хэмжээ стрессийн явцаас үл хамааран нэмэгдэж, харин хоолны хэмжээ цочмог стрессийн үед багасаж, архаг стрессийн улмаас нэмэгдэж байна.

Үндэслэл: Таргалалт нь эрүүл мэнд, нийгмийн тулгамдсан асуудлын нэг бөгөөд биеийн жингийн илүүдлийн улмаас нас барах эрсдэл эрэгтэйчүүдэд 45%, эмэгтэйчүүдэд 56%-аар нэмэгддэг ажээ[1]. Таргалалт нь зүрхний шигдээс, элэг өөхлөлт, ясны сийрэгжилт, чихрийн шижин, цусны даралт ихсэлт, цөсний чулуужилт, нойр булчирхай, ходоодны үрэвсэл, бодисын солилцооны хамшинж, хавдар гэх мэт олон өвчний нөхцөл, эрсдэлт хүчин зүйл болж байна[2]. Амьдралын буруу хэв маяг, хооллолт, хөдөлгөөний хомсдол, сэтгэл зүйн тогтворгүй байдал, стресс, нойргүйдэл, ажлын ачаалал, дотоод шүүрлийн эмгэгүүд, эмийн бүтээгдэхүүн гэх мэтчилэн хүчин зүйлс таргалалтад нөлөөлж байдаг. Эдгээрээс таргалалтын эмгэгжам дахь стрессийн нөлөө болон стрессийн үеийн хооллолтын механизмыг нарийн тайлбарласан судалгааны үр дүн хомс байна. Стресст өртсөн насанд хүрэгчдийн 51% нь хүнд хэлбэрт шилжин депресст орсон, 61% нь байнгын сэтгэл түгшилтэй байдаг хэмээн тэмдэглэжээ. Орчны тааламжгүй,

сөрөг нөлөөллийн улмаас хүн болон амьтны бие махбодод үүсч байгаа сөрөг байдлыг стресс гэдэг. Стрессийн үед ургал мэдрэлийн тохируулгын тэнцвэр алдагдсанаар сэтгэц мэдрэлийн талаас өөрчлөлтүүд гардаг[4]. Түүнчлэн, гипоталамусын паравентрикуляр бөөмийн нейронуудаас кортикотропин-өдөөгч-даавар (CRH) шүүрэх нь зан төлөв өөрчлөгдөхөд хүргэж буйг тогтоосон. Архаг ба цочмог стресс хооллолтын байдалд хэрхэн нөлөөлдөг талаар шинжлэх ухааны олон нотолгоо байдаг ч нейрофизиологийн үндсэн механизм нь бүрэн тодорхойлогдоогүй хэвээр байна. Стрессийн түвшнээс хамаарч кортизолын түвшин нэмэгдэж, амттай хүнс их хэмжээгээр идсэнээр хэвлийн таргалалт үүсэж, бодисын солилцоо алдагддаг[5]. Дээрхийг нэгтгэн дүгнэвэл стресс нь нийгэм, эрүүл мэндийн тулгамдсан асуудал бөгөөд стрессийн үед бие махбодод явагдах нарийн төвөгтэй урвал, механизмыг ойлгох зайлшгүй шаардлагатай байна. Туршилтын амьтанд стресс үүсгэсэн загварыг өөрийн орны нөхцөлд нутагшуулснаар дараа дараагийн судалгааны суурь болох боломжтой юм.

Зорилго: Стрессийн нөлөөгөөр туршилтын C57BL/6J хулганад гарсан хооллолтын өөрчлөлтийг судлан тогтоох

Зорилт:

1. Туршилтын хулганад Social Defeat стресс үүсгэн, хөдөлгөөний идэвхийг үнэлж, батлах
2. Стресст өртсөн туршилтын хулганы цусан дахь глюкозын агууламжийг тодорхойлж, хооллолтын өөрчлөлтийг судлах

Арга, аргачлал: Туршилтын амьтдыг туршилт эхлэхээс 7 хоногийн өмнө нэг, нэгээр нь тусгаарлан, саванд байрлуулсан. Туршилтыг бүлэг хулганы стандарт савны (CLEA, Япон) ¼ хэсэгт (16x9.5 см) явуулсан бөгөөд туршилтын хулгануудыг (C57BL/6J) түрэмгийлэгч хулганы (BALB/C) саванд хийгээд 10 минут стресс үүсгэсэн ба дараа нь гэрэл нэвтэрдэг, тунгалаг, нүхтэй таславчаар 90 минут тусгаарлав. Энэхүү аргачлалын дагуу цочмог стрессийг 1 удаа, архаг стрессийг 10 өдөрт тус бүр 1 удаа үүсгэсэн ба туршилтын явцыг видео камераар бичив.

Туршилтын турш хулганад тэжээл, усыг хязгаарлалтгүйгээр өгсөн[6]. Хулганы идсэн хоолны хэмжээг өдөр бүр 17:00 цагт, 16 хоногийн турш электрон жингээр (AND KC-200, Солонгос) хэмжсэн. Стресс үүсгэсний дараа хулганы сүүлний цусан дахь глюкозын хэмжээг глюкометрээр (Tyson Bio, Герман) тодорхойлсон бөгөөд стрессийн түвшинг нэмэх замын сорилоор 5 минутын хугацаанд үнэлж, видео камераар бичлэг хийв[7]. Нэмэх зам дээрх хулганы явсан бичлэгийг DeepLabCut программ ашиглан, зураглалыг хулганы толгойн цэгийг ашиглаж гаргав.

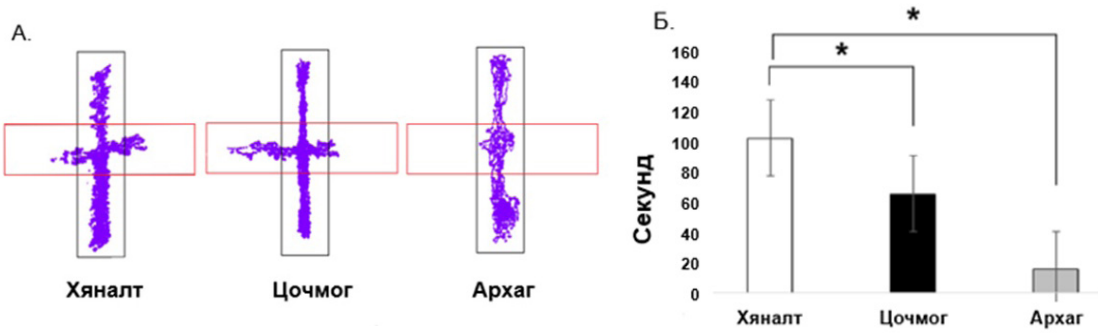
Судалгааны үр дүнгийн статистик ялгаатай байдлыг 95% итгэх завсарт P утга, T тестийн аргаар тооцож, үр дүнг харьцуулав. АШУҮИС-ийн Судалгааны Ёс Зүйн Хяналтын Хорооны хурлаар судалгааг эхлэх зөвшөөрөл (протокол №2021/3-12) авсан.

Үр дүн: Түрэмгийлэгч хулгана туршилтын бүлгийн хулганыг түрэмгийлсэн хугацааг тооцож үзэхэд цочмог стрессийн турш дунджаар 118.25±38.15 секунд довтолсон бол 80±20.4 секунд хамгаалах байрлал авсан. Харин архаг стрессийн турш 76.25±18.43 секунд довтолж, 142.875±46.41 секунд хамгаалах байрлал авав (Хүснэгт 1).

Хүснэгт 1. Social Defeat туршилтын үеийн биеийн байрлалын өөрчлөлт: цочмог болон архаг бүлэгт

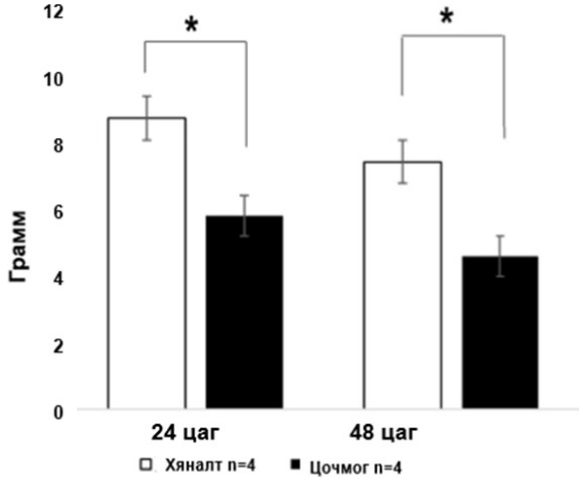
Биеийн байрлал	Довтолсон хугацаа (сек)	Хамгаалах байрлал авсан хугацаа (сек)
Цочмог	118.25±38.15	80±20.4
Архаг	76.25±18.43	142.87±46.41

Туулсан замын зураглалыг хулганы толгойн 1 цэгийг маркер болгон DeepLabCut программаар гаргасан (улаан шугамаар нээлттэй замыг, хар шугамаар хаалттай замыг тэмдэглэв). Стрессийн нөлөө ихсэх тусам нээлттэй зам дээр өнгөрүүлэх хугацаа эрс багасаж байв (Зураг 1.А). Нэмэх замын сорилоор архаг (18.135±15.15 сек) болон цочмог (76.53±57.84 сек) стресст өртсөн бүлгүүдийг хяналтын бүлэгтэй (119.8±15.52 сек) харьцуулахад нээлттэй зам дээр бага хугацааг өнгөрүүлэв (Зураг 1.Б).



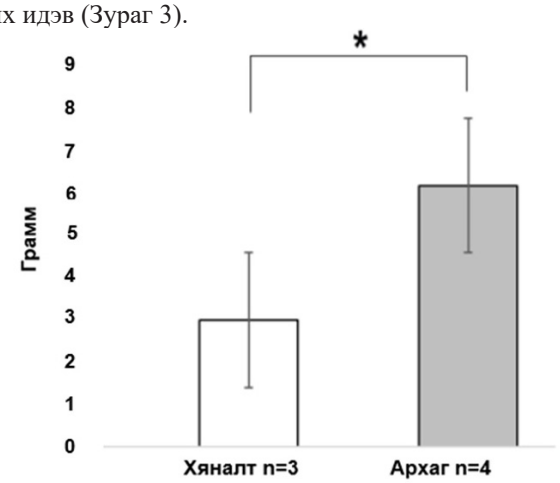
Зураг 1. 3 бүлгийн хулгануудын туулсан зай
А.Нэмэх замын сорилоор, DeepLabCut программаар
Б. Нэмэх замын сорилын нээлттэй зам дээр өнгөрүүлсэн хугацаа, 3 бүлгээр

Эхний 24 цагт идсэн хоолны хэмжээг тооцоход цочмог стресст өртсөн хулгануудад 6.32±1.08 гр, хяналтын бүлгийн хулгануудад 9.52±2.5 гр идсэн. Харин 48 цагийн дараа цочмог стресст өртсөн хулгануудад 5±0.88 гр идсэн нь хяналтын бүлгийн хулганаас (8.1±2.04 гр) статистик үнэн магадлал бүхий бага байлаа (Зураг 2).



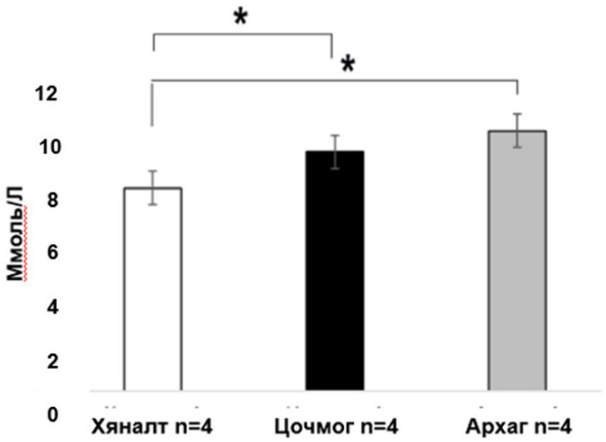
Зураг 2. Идсэн хоолны хэмжээ, цочмог стрессийн дараа: Цагаан-хяналт, хар-цочмог бүлгийг тэмдэглэв (*p<0.05).

Идсэн хоолыг өдөр бүр тогтмол 17:00 цагт хэмжихэд архаг стресст өртсөн бүлэг туршилтын 16 дахь өдөр 6.12±0.78 гр идэж, хяналтын бүлгээс (2.96±0.9 гр) статистик үнэн магадлал бүхий ялгаатай их идэв (Зураг 3).



Зураг 3. Идсэн хоолны хэмжээ, 16 өдрийн дараа: Цагаан-хяналт, саарал-архаг бүлгийг тэмдэглэв (*p<0.05).

Стрессийн дараа цусан дахь глюкозын хэмжээг тодорхойлоход архаг стресст өртсөн бүлэг (9.67±1.56 ммоль/л) ба цочмог стресст өртсөн бүлгийг (8.9±1.11 ммоль/л) хяналтын бүлэгтэй (7.55±0.79 ммоль/л) харьцуулахад статистик үнэн магадлал (p<0.05) бүхий ялгаатай их байв (Зураг 4).



Зураг 4. Цусан дахь глюкозын хэмжээ: Цагаан-хяналт, хар-цочмог, саарал-архаг бүлгийг тус тус тэмдэглэв (*p<0.05).

Хэлцэмж: Бид бүхэн энэхүү судалгаагаар C57BL/6J ба BALB/C үүлдрийн эр хулгануудад стресс үүсгэж, стрессийг хөдөлгөөний идэвхийн өөрчлөлтөөр үнэлэн, цусан дахь глюкоз болон хулганы идсэн хоолыг хэмжлээ. Туршилтын амьтан стресст өртсөн эсэхийг төрөл бүрийн замын, задгай талбайн, сэлэлтийн гэх мэт тусгай сорилоор үнэлэхээс гадна зан төрхийг тодорхойлох ажиглалтын төрөл бүрийн арга байдаг. Харин бид “Нэмэх замын сорил”-оор хулганы хөдөлгөөний идэвх дээр үндэслэн туршилтын хулганад стресс үүссэн эсэхийг баталсан ба туршилтын хулганыг нэмэх зам дээр 5 минут явуулж, түүнийг эгц дээрээс нь видео камераар бичин, аль зам дээр хэр хугацаа өнгөрүүлсэн болохыг ажиглалтын аргаар, явсан замын зураглалыг DeepLabCut программаар үнэллээ. Калифорнийн их сургуулийн сэтгэц судлалын тэнхимийн судлаачдын хийсэн судалгаагаар хяналтын бүлгийн хулгануудыг (n=9) стресст өртсөн хулгануудтай харьцуулахад (n=7) хаалттай зам дээр илүү хугацааг өнгөрүүлж ($t(14)=4.87$, $p<0.001$), нээлттэй зам дээр бага хугацаа өнгөрүүлсэн ($t(14)=2.06$, $p<0.02$) байна. Мөн хяналтын болон туршилтын 2 бүлгийн хооронд хөдөлгөөний ялгаа илрээгүй ($p>0.05$) байна[8]. Мөн дээрх судлаачид 10 хоногийн стрессийн нөлөөгөөр сэтгэл түгшилтэй төстэй зан үйл илэрдэг болохыг нэмэх замын сорилоор баталсан.

Нэмэх замын сорилоор хяналт болон туршилтын бүлгийн амьтдын хооронд хөдөлгөөний ялгаа ажиглагдсан бөгөөд хяналтын хулгануудад хөдөлгөөн их байх ба нээлттэй зам дээр илүү хугацаа өнгөрүүлж байв. Харин цочмог стрессийн үед хаалттай зам дээр илүү хугацаа өнгөрүүлж, хөдөлгөөний идэвх харьцангуй тогтвортой байсан бол архаг стрессийн үед хөдөлгөөн мэдэгдэхүйц багассан ба хаалттай зам дээр илүү хугацааг өнгөрүүлсэн. Эдгээр үр дүнг бусад судлаачдын нэмэх замын сорилын үр дүнтэй харьцуулахад ижил байна гэж үзэж байна. Tataranni PA (1996) тэргүүтэй судлаачдын хийсэн судалгааны ажилд архаг стрессийн дараах глюкокортикоидын ихсэл нь генийн идэвхжилд оруулж, зан төрхийн өөрчлөлтөд хүргэдэг байж магадгүй хэмээн тэмдэглэжээ. Мөн глюкокортикоидын түвшин нэмэгдэх нь хүн болон мэрэгчдийн хооллох зан

үйлийг өөрчилдөг ба Кушингийн өвчтэй хүмүүсийн хоолны дуршил уг дааврын ихсэлтэй холбоотой нэмэгдсэн байна[9]. Тиймээс архаг стрессийн нөлөөгөөр глюкокортикоидын шүүрэл ихэссэний улмаас POMC нейроны дохио дамжуулалтад өөрчлөлт орж, хоолны дуршил нэмэгддэг гэж таамаглаж байна.

Бидний судалгаагаар эхний 24 цагт цочмог стресст өртсөн хулгануудын 6.325±1.08 гр хяналтын бүлгийн хулгануудын 9.52±2.5 гр идсэн ба 48 цагийн дараа цочмог стресст өртсөн хулгануудын 5±0.88 гр, хяналтын бүлгийн хулгануудын 8.1±2.04 гр идэж статистик үнэн магадлал бүхий ялгаа ажиглагдав ($p<0.05$). Өдөр бүр, тогтмол 17:00 цагт идсэн хоолыг хэмжихэд архаг стресст өртсөн бүлэг 83.025±6.923 гр, хяналтын бүлэг 76.433±8.19 гр болж архаг стрессийн үед хооллолт ихсэж буй нь бидний судалгааны үр дүн бусад судалгааны дүнтэй тохирч байгааг илтгэж байна.

Ионсей их сургуулийн судлаачдын хийсэн судалгаагаар гипоталамусын ARC дахь NPY нейронууд биш харин POMC мэдрэлийн эсүүд архаг стрессийн дараа хооллох зан үйлийг өөрчлөхөд чухал үүрэг гүйцэтгэдэг болохыг тогтоожээ[10]. Архаг стрессийн үед POMC нейронуудын идэвхжил буурдаг[11] ба түүний механизм тодорхойгүй байгаа ч стресс үүсгэгч хүчин зүйлсийн төрөл, үргэлжлэх хугацаа нь хооллох зан үйлд нөлөөлдөг байж болох юм.

Дүгнэлт:

1. Стрессийн нөлөөгөөр идэвхтэй хөдөлгөөн буурч байна.
2. Цусны глюкозын хэмжээ стрессийн явцаас үл хамааран нэмэгдэж, харин хоолны хэмжээ цочмог стрессийн үед багасаж, архаг стрессийн улмаас нэмэгдэж байна.

Ном зүй:

1. *Camacho S, Ruppel A. Is the calorie concept a real solution to the obesity epidemic? Glob Health Action. 2017;10(1):1289650.*
2. *Esler M, Straznicky N, Eikelis N, Masuo K, Lambert G, Lambert E. Mechanisms of sympathetic activation in obesity-related hypertension. Hypertension. 2006;48(5):787-796.*
3. *Schneiderman N, Ironson G, Siegel SD. Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. Annu Rev Clin Psychol. 2005;1:607-628.*
4. *Sinha R, Jastreboff AM. Stress as a common risk factor for obesity and addiction. Biol Psychiatry. 2013;73(9):827-835.*
5. *Gianferante D, Thoma MV, Hanlin L, et al. Post-stress rumination predicts HPA axis responses to repeated acute stress. Psychoneuroendocrinology. 2014;49:244-252.*
6. *Golden SA, Covington HE, 3rd, Berton O, Russo SJ. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. Nat Protoc. 2011;6(8):1183-1191.*
7. *Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. Methods Mol Biol. 2019;1916:69-74.*
8. *Iniguez SD, Riggs LM, Nieto SJ, et al. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. Stress. 2014;17(3):247-255.*
9. *Tataranni PA, Larson DE, Snitker S, Young JB, Flatt JP, Ravussin E. Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. Am J Physiol. 1996;271(2 Pt 1):E317-325.*
10. *Ha GE, Cheong E. Chronic Restraint Stress Decreases the Excitability of Hypothalamic POMC Neuron and Increases Food Intake. Exp Neurobiol. 2021;30(6):375-386.*
11. *Qu N, He Y, Wang C, et al. A POMC-originated circuit regulates stress-induced hypophagia, depression, and anhedonia. Mol Psychiatry. 2020;25(5):1006-1021.*

Assessment of social defeat stress and feeding behavior in mice

Uyanga A, Ulziikhuu T, Munkhzol M, Zesemdorj O

Department of pathophysiology, Bio-Medical school, MNUMS
E-mail: 2000uyanga@gmail.com, Tel: 88005187

Background: Obesity is a global social and health problem, and one of the main factor is stress. Therefore, the study of how stress affects some physiological parameters is the basis of our study.
Aim: Approve stress by changes in motor activity and some physiological parameters induced by social defeat stress.
Material and methods: In our study, we used C57BL/6J mice bred in a controlled environment (control, acute and chronic 4 male mice each) and BALB/C male mice. Stress was performed according to a social defeat stress development method developed by Sam A Golden. The test mice (C57BL/6J) were kept in an aggressive (BALB/C) mouse cage for 10 min and then isolated for 90 min on a transparent plate with a light-penetrating hole. The experimental process was recorded on a HD video camera and the stress level was assessed using the DeepLabCut software. Blood was taken from the mouse's tail and glucose was measured with a glucometer (Tyson Bio). Meals were measured daily before dark everyday.Two-tailed Student's t-tests were used for analyses implicating two-group comparisons.
Results: In the elevated plus maze test, the chronic (274.35±44.08 sec) and acute (220.76±15.81 sec) stress groups spent longer on the closed arm ($p<0.05$) compared to the control group (180.48±15.44 sec). After stress, the chronic (9.67 mml/L) and acute (8.9 mml/L) groups had statistically higher blood glucose levels ($p<0.05$) than the control group. In terms of food intake, acute stress group mice ate less food than the control group in 48 hours ($p<0.05$). The amount of food-intake of chronically stressed mice on the 16th day of the experiment was statistically significant ($p<0.05$).
Conclusion:

1. Stress decreases the total distance traveled of experimental mice.
2. As a result of acute and chronic stress, blood glucose increases and acute stress reduces the amount of food-intake, and chronic stress increases the amount of food-intake.

Keywords: Social defeat, plus maze, stress, glucose, C57BL/6J