

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623279>

Формирование особо устойчивой долговременной памяти в модели посттравматического стрессового расстройства у мышей

Т.А. Заморина^{1*}, К.А. Торопова¹, О.И. Ивашкина¹, К.В. Анохин^{1, 2}¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация;² Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Память — определяющее свойство когнитивных систем. Ключевая функция памяти, осуществляемая мозгом человека и животных, — возможность с одного раза и надолго, нередко на всю жизнь, запоминать релевантные события, не нарушая данный памятный след обучением в других задачах. Выявление механизмов такой долговременной памяти является одной из ключевых нерешённых задач нейронауки. Однако надёжной экспериментальной модели однократной пожизненной памяти у лабораторных животных, позволяющей исследовать лежащие в её основе нейробиологические механизмы, до сих пор разработано не было. Мы предположили, что такая модель может быть создана на основе животной модели посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) [1]. В модели на мышах ПТСР индуцируют нанесением сильного электрокожного раздражения лап (ЭКР), вследствие чего мыши формируют устойчивую к угашению память о травме, сопровождающуюся перестройками в поведении, которые носят долговременный характер [1]. Мы предположили, что подобная модель может стать основой для исследования механизмов, лежащих в основе устойчивой долговременной памяти.

Основным аргументом в пользу использования модели ПТСР как модели такой долговременной памяти является повышенная устойчивость травматической памяти по сравнению с обычной аверсивной памятью [2]. В качестве инструмента для оценки устойчивости памяти могут быть использованы амнестические агенты, такие как блокаторы синтеза белка, в связи с тем, что синтез белка необходим для консолидации долговременной памяти [3]. Также было показано, что введение блокатора синтеза белка мышам перед травматическим опытом нарушает у них развитие ПТСР в модели индукции расстройства при предъявлении запаха хищника [4]. Однако неизвестно, как влияет нарушение травматической памяти на развитие ПТСР при нанесении сильного ЭКР и что происходит с памятью в долгосрочной перспективе — сохраняется ли нарушение, например, спустя месяц после воздействия.

Учитывая наличие стадии консолидации, зависимой от синтеза белка, при формировании травматической памяти, и перестроек системы стрессорного ответа, сопровождающих ПТСР, Siegmund и Wotjak [1] предложили двухкомпонентную гипотезу индукции расстройства. Согласно этой гипотезе, формирование ПТСР включает ассоциативный компонент — память об обстановке события, и неассоциативный — сенситизацию системы ответа на стресс, которые взаимно усиливают друг друга. Кроме того, известно, что формирование нормальной аверсивной памяти нарушается, если при обучении животные получают немедленное аверсивное раздражение, не имея таким образом времени для формирования обстановочной памяти [5]. Учитывая вышесказанное, мы предположили, что разделение во времени двух компонентов травматического опыта, экспозиции в обстановке травмы и самого травматического воздействия, может привести к нарушению развития ПТСР.

Цель исследования. Экспериментальное моделирование и изучение нейробиологических механизмов формирования особо устойчивой долговременной памяти после однократного обучения у взрослых мышей. В работе мы охарактеризовали поведенческие показатели животных через разные периоды времени после травматического или аверсивного опыта, а также оценили устойчивость травматической и нормальной аверсивной памяти при блокаде синтеза белка в мозге. Кроме того, мы исследовали возможность формирования долговременной травматической памяти у мышей после нанесения им сильного ЭКР в предварительно незапомненной обстановке, а также при расставлении во времени формирования памяти об обстановке и травматического воздействия.

В работе использовали самцов мыши линии C57Bl/6 в возрасте 3–4 месяца и 15–18 месяцев (в эксперименте на пожилых мышах). Для индукции ПТСР животных помещали в камеру с электрифицированным полом и через 170 с подвергали травматическому опыту (3 удара током, силой 1,5 мА, длительностью 10 с) затем оставляли в камере на 60 с. Для формирования нормальной аверсивной памяти наносили ЭКР умеренной интенсивности (1 удар током, силой

Рукопись получена: 15.05.2023

Рукопись одобрена: 26.11.2023

Опубликована online: 20.01.2024

1,0 мА, длительностью 2 с), которое приводит к формированию условного рефлекса замирания (УРЗ). Для тестирования сформированной памяти животных вновь помещали в остановку обучения через 7 дней. Для тестирования поведенческой сенситизации, сопровождающей развитие ПТСР, — в новую незнакомую остановку, не похожую на обстановку обучения, где животным предъявляли незнакомый звук в норме не вызывающий замирания у мышей. Для оценки степени генерализации страха, ещё одного типичного симптома ПТСР, мышей помещали в обстановку, напоминающую обстановку обучения. Кроме того, в некоторых экспериментах дополнительно использовали безопасную для животных обстановку. Уровень страха животных оценивали по длительности эпизодов замирания. Уровень тревожности оценивали в классическом тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ).

В рамках разработки модели пожизненной памяти мы сравнивали поведенческие показатели животных, обученных в модели ПТСР (группа ПТСР), парадигмы УРЗ (группа УРЗ) и группы активного контроля (АК), животные которой не получали аверсивного воздействия в обстановке эксперимента, спустя 7 дней, 1 и 3 месяца после обучения. После индукции ПТСР мыши демонстрировали повышенный уровень страха до 3 месяцев и повышенный уровень сенситизации и генерализации страха через 7 дней после воздействия по сравнению с группами УРЗ и АК. Кроме того, для группы ПТСР был характерен более высокий уровень замирания до 1 месяца и сниженное количество заходов в закрытые рукава ПКЛ до 3 месяцев после индукции по сравнению с группами УРЗ и АК. Группа УРЗ также демонстрировала повышенный уровень страха в течение 3 месяцев в обстановке обучения по сравнению с группой АК, однако данный показатель не превышал уровня страха характерного для группы ПТСР. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что ассоциативная память, формирующаяся в модели ПТСР у мышей, сохраняется в течение как минимум 3 месяцев, тогда как обычная аверсивная память к этому моменту угасает и слабо манифестируется в поведении. Таким образом, предварительные результаты дают основание полагать, что индукция ПТСР действительно может служить моделью устойчивой долговременной памяти у лабораторных животных, в отличие от парадигмы УРЗ.

В связи с тем, что при разработке модели пожизненной памяти предполагается проведение тестирования спустя полгода и год после обучения, то есть у достаточно пожилых животных, встаёт вопрос о том, как влияет старение на формирование и хранение памяти в модели ПТСР и парадигме УРЗ. Чтобы охарактеризовать формирование травматической и аверсивной памяти у животных при старении лабораторных мышей мы исследовали формирование ПТСР и УРЗ у мышей возрастом 15–18 месяцев. У мышей группы ПТСР был повышен уровень страха в обстановке обучения, а также происходило усиление страха в новых обстановках, по сравнению с животными с обычной аверсивной памятью, а также повышение уровня тревожности в тесте ПКЛ по сравнению с контрольными животными. Таким образом, у пожилых мышей происходит формирование травматической памяти и развитие симптомов ПТСР, что позволяет проводить тестирование при разработке модели долговременной памяти на поздних сроках жизни животных.

Для характеристики устойчивости травматической памяти мы использовали блокатор синтеза белка — циклогексимид (ЦГМ). Блокатор вводили внутривентриально за 30 минут до индукции ПТСР или обучения в парадигме УРЗ в дозе 95 мг/кг (группы ПТСР-ЦГМ и УРЗ-ЦГМ). Контрольные группы животных получали инъекцию физиологического раствора (ФР; группы ПТСР-ФР и УРЗ-ФР). Группа УРЗ-ЦГМ демонстрировала сниженный уровень страха по сравнению с группой, получившей инъекцию ФР спустя 7 и 30 дней после воздействия. Тогда как животные группы ПТСР-ЦГМ имели такой же уровень страха, как мыши группы УРЗ-ФР, и не демонстрировали повышенного уровня сенситизации или генерализации. Таким образом, в отличие от обычной аверсивной памяти, которая полностью нарушается введением блокатора синтеза белка при обучении, травматическая память может быть лишь частично ослаблена в результате блокады синтеза белка в момент её формирования, что говорит о её особой устойчивости к нарушающим воздействиям.

Для тестирования гипотезы о том, что при формировании устойчивой памяти в модели ПТСР имеют место два взаимосвязанных процесса — формирование обстановочной памяти и индукция неспецифических перестроек системы стрессорного ответа как реакция на само травматическое воздействие — мы исследовали возможность формирования травматической памяти при отставлении по времени обследования обстановки и нанесения ЭКР. Как при расставлении во времени экспозиции в обстановке и сильного ЭКР, так и при получении животными только немедленного сильного ЭКР мыши демонстрировали в обстановке обучения такой же уровень страха, как и мыши, получившие ЭКР умеренной силы спустя 7 дней после воздействия. Кроме того, при расставлении во времени экспозиции и травматического воздействия животные не развивали повышенного уровня страха, свойственного для животных с ПТСР, при попадании в незнакомую обстановку, а также имели более низкий уровень тревожности. Таким образом, при расставлении по времени предэкспозиции в обстановке и травматического воздействия, а также при немедленном травматическом воздействии у мышей не нарушается формирование ассоциативной аверсивной памяти, но не происходит индукции ПТСР. Следовательно, наличие сформированной обстановочной памяти является необходимым для формирования травматической памяти и развития ПТСР у мышей.

На основе полученных нами результатов мы сделали следующие выводы. Аверсивная память имеет тенденцию к угасанию со временем, тогда как травматическая память остается устойчивой по крайней мере спустя 3 месяца после индукции, что делает ПТСР подходящей кандидатной лабораторной моделью особо устойчивой долговременной памяти. У пожилых мышей (15–18 месяцев) в модели индукции ПТСР происходит такое же, как и у молодых животных (3–4 месяца), формирование травматической памяти и развитие симптомов ПТСР. Для развития ПТСР у мышей необходимо совпадение по времени формирования памяти об обстановке, в которой произошло получение травмы и самого травмирующего воздействия.

Ключевые слова: посттравматическое стрессовое расстройство; обстановочная память; аверсивная память; долговременная память; модель на животных; условно-рефлекторное замирание; блокада синтеза белка; циклогексимид.

Как цитировать:

Заморина Т.А., Торопова К.А., Ивашкина О.И., Анохин К.В. Формирование особо устойчивой долговременной памяти в модели посттравматического стрессового расстройства у мышей // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 4. С. 742–747. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623279>

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект», гранта РФФИ № 20-015-00427, а также Некоммерческого Фонда развития науки и образования «Интеллект».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Siegmund A., Wotjak C.T. A mouse model of posttraumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear // *Journal of Psychiatric Research*. 2007. Vol. 41, N 10. P. 848–860. doi: 10.1016/j.jpsychires.2006.07.017
2. Milad M.R., Orr S.P., Lasko N.B., et al. Presence and acquired origin of reduced recall for fear extinction in PTSD: results of a twin study // *Journal of Psychiatric Research*. 2008. Vol. 42, N 7. P. 515–520. doi: 10.1016/j.jpsychires.2008.01.017
3. Kwapis J.L., Jarome T.J., Schiff J.C., Helmstetter F.J. Memory consolidation in both trace and delay fear conditioning is disrupted by intra-amygdala infusion of the protein synthesis inhibitor anisomycin // *Learning & Memory*. 2011. Vol. 18, N 11. P. 728–732. doi: 10.1101/lm.023945.111
4. Kozlovsky N., Kaplan Z., Zohar J., et al. Protein synthesis inhibition before or after stress exposure results in divergent endocrine and BDNF responses disassociated from behavioral responses // *Depression and Anxiety*. 2008. Vol. 25, N 5. P. E24–E34. doi: 10.1002/da.20366
5. Rudy J.W., Huff N.C., Matus-Amat P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2004. Vol. 28, N 7. P. 675–685. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.09.004

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

* Т.А. Заморина; адрес: Российская Федерация, 119234, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12; e-mail: motorina1814@mail.ru

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623279>

Highly stable long-term memory in a mouse model of post-traumatic stress disorder

T.A. Zamorina^{1*}, K.A. Toropova¹, O.I. Ivashkina¹, K.V. Anokhin^{1, 2}¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;² Institute of Normal Physiology named after P.K. Anokhin, Moscow, Russian Federation, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

The retention of information represents a defining trait of cognitive systems. The primary function of an organism's memory is to retain engrams of unique experiences for extended periods, without interrupting memory trace during new learning processes. One of the cardinal unsolved issues in neuroscience lies in unveiling the mechanisms responsible for long-term memory. Despite this, a trustworthy experimental animal model for single-trial long-term memory remains undeveloped. To address this challenge, we aimed to create an animal model to study lifelong memory formation with a single trial. We used a mouse model of post-traumatic stress disorder (PTSD) for this purpose [1]. In this model, mice exposed to a powerful electrical foot shock develop highly persistent traumatic memories, which results in long-term behavioral changes [1]. Our hypothesis was that this model could uncover the mechanisms related to lifelong memory.

The primary rationale for adopting the PTSD model as a model of lifelong memory pertains to the heightened durability of traumatic memories in comparison to conventional aversive memories [2]. Protein synthesis inhibitors, which are needed for long-term memory consolidation, can be used as amnesic agents to evaluate memory stability [3]. In a PTSD model using predator scent, the administration of a protein synthesis blocker prior to a traumatic experience disrupts the development of PTSD in mice [4]. However, it remains unclear how traumatic memory impairment affects PTSD development in the footshock model and whether the impairment persists long-term.

Based on the evidence that the formation of PTSD necessitates the consolidation of associative memory, which is reliant on protein synthesis and coincides with changes in the stress response system, Siegmund and Watzhek [1] present a two-part proposal concerning the onset of PTSD. The two-part hypothesis regarding PTSD posits that PTSD formation involves sensory conditioning and sensitization processes that mutually reinforce one another. In line with this theorem, we considered the effects of studying context and exposure timing on the development of post-traumatic stress disorder, as it could potentially interfere with sensory conditioning formation [5].

The aim of this study is to create an experimental approach for developing enduring long-term memory through a single trial event on adult mice. We methodically analyzed behavioral expressions and the endurance of normal and traumatic fear memory, as well as their sensitivity to protein synthesis inhibition. Additionally, we investigated the effects of separating the timing of the associative and aversive elements of traumatic memory on PTSD development in a mouse model.

The experiment involved male C57Bl/6 mice, aged between 3–4 months and 15–18 months (for an investigation into aged mice), which were placed in an electrified chamber. After 170 seconds, the mice experienced either one footshock (1.5 mA, 2 s) to elicit fear memory or three footshocks (1.5 mA, 10 s) for PTSD induction. After receiving the footshock, the mouse was held in the chamber for 60 seconds before being returned to its home cage. A memory test was conducted seven days later by placing the mice back in the same context. To assess the existence of standard PTSD symptoms, like sensitization and generalization, the creatures were exposed to an unfamiliar context and an unexpected auditory stimulus, respectively. In the experiment, animals were placed in unfamiliar or familiar safe contexts that differed from their previous ones. The duration of freezing was measured to assess fear and evaluate memory retention, sensitization, and generalization. Anxiety levels were evaluated using the elevated plus maze test.

In the process of constructing a highly stable long-term memory model, we evaluated the behavioral performance of PTSD-induced (PTSD), fear-conditioned (FC), and active control (AC) groups of animals at 7 days, 1 month, and 3 months after exposure. As a result of PTSD induction, mice displayed increased fear levels for up to 3 months in the training context, along with heightened fear sensitization and generalization at 7 days following exposure, relative to the FC and AC groups. The PTSD group exhibited heightened freezing behavior within a month and a decreased number of entries to the closed arms during the initial three months following exposure when contrasted with the FC and AC groups. We additionally noted that the FC group displayed raised fear levels in contrast to the control animals up to 3 months post-exposure, albeit lower in magnitude than that of the PTSD group. The FC group, similar to the PTSD

Received: 15.05.2023

Accepted: 26.11.2023

Published online: 20.01.2024

group, showed increased sensitization and generalization compared to control animals at 1 week post-exposure, but to a lesser extent than we observed in the PTSD group. The findings suggest that traumatic memory remains present for a minimum of three months, whereas fear memory in the fear conditioning paradigm diminishes in intensity during this time. Hence, PTSD induction effectively functions as an animal model of profoundly stable long-term memory, in opposition to the fear conditioning paradigm.

As the high stable long-term memory model is designed for testing in senior animals, the impact of aging on traumatic memory formation and storage becomes an important inquiry at six months and one year following exposure. We analyzed the formation of both aversive and traumatic memory in mice aged 15–18 months, one week after footshock exposure. In the study involving older mice, the PTSD group exhibited increased levels of fear memory and sensitization when compared with both the FC and AC groups, in addition to displaying higher levels of generalization and anxiety when compared with the AC group. Furthermore, mice that underwent rear-conditioning showed heightened levels of fear during learning, fear sensitization, and generalization, although not anxiety. These findings demonstrate the formation of traumatic and aversive memory in aged mice, indicating that conducting memory tests six months and a year after exposure is an appropriate approach.

To evaluate the durability of traumatic and aversive memory, we administered a protein synthesis inhibitor called cycloheximide (Chm) to interfere with memory formation. Mice were given a cycloheximide solution (95 mg/kg) via intraperitoneal injection 30 minutes before footshock (Chm-PTSD and Chm-FC groups) while control animals received a saline injection (Sal-PTSD, Sal-FC). After training, the Chm-FC group displayed a decrease in freezing rate when compared to the saline-injected group at the 7- and 30-day marks. The Chm-PTSD group exhibited fear levels comparable to those of the Sal-FC group in the training context, and did not display sensitization or generalization of fear. These findings suggest that inhibiting protein synthesis during memory formation resulted in complete amnesia for standard aversive memory and merely weakened traumatic memory. As a result, only the associative component of traumatic memory remained intact, while nonspecific symptoms of PTSD were absent. The strong resilience of memory in the PTSD model to severe disruptions, such as protein synthesis blockade, also confirms its stability, which facilitates exploration of lifelong memory mechanisms in the PTSD model.

To examine the timing effect of the associative and aversive component of PTSD development, we evaluated traumatic memory formation when contextual memory formation was absent, and contextual exploration occurred three days before shock cessation. A week after exposure to immediate and intense footshock, mice in the experimental group exhibited lower levels of fear, reduced fear sensitization, and less anxiety compared to those in the PTSD-induced group. If an intense foot shock was preceded by a contextual study three days earlier, the animals exhibited lower levels of fear in an unfamiliar, safe context, and reduced anxiety compared to the mice induced with PTSD. In both cases, the fear level after the shock cessation was identical to that of the mice who experienced an immediate, moderate shock. Based on our findings, we concluded that aversive memory forms in the absence or prior formation of contextual memory in relation to traumatic exposure. However, PTSD induction does not occur under such circumstances. This indicates that contextual memory needs to be formed simultaneously with the traumatic event for the development of traumatic memory in the mouse model of PTSD.

In summary, our findings indicate that aversive memory tends to fade over time, while traumatic memory remains stable for a minimum of 3 months following its induction. Therefore, PTSD proves to be a fitting candidate laboratory model for high, stable, and long-term memory. Aged mice aged between 15–18 months display the formation of traumatic memory and experience PTSD symptoms in a manner similar to adult animals aged between 3–4 months in the PTSD model. For the induction of PTSD in mice, contextual memory formation about the traumatic environment and the traumatic event occurrence may coincide, which is crucial.

Keywords: post-traumatic stress disorder; fear memory; contextual memory; aversive memory; long-term memory; animal model; fear conditioning; protein synthesis blockade; cycloheximide.

To cite this article:

Zamorina TA, Toropova KA, Ivashkina OI, Anokhin KV. Highly stable long-term memory in a mouse model of post-traumatic stress disorder. *Genes & Cells*. 2023;18(4):742–747. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623279>

ADDITIONAL INFORMATION

Funding sources. This research was funded by grant No. 20-015-00427 from the Russian Foundation for Basic Research and Non-commercial Foundation for the Advancement of Science and Education “Intellect” with the support of the Lomonosov Moscow State University Interdisciplinary Scientific and Educational School “Brain, Cognitive Systems, Artificial Intelligence”.

REFERENCES

1. Siegmund A, Wotjak CT. A mouse model of posttraumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear. *Journal of Psychiatric Research*. 2007;41(10):848–860. doi: 10.1016/j.jpsychires.2006.07.017
2. Milad MR, Orr SP, Lasko NB, et al. Presence and acquired origin of reduced recall for fear extinction in PTSD: results of a twin study. *Journal of Psychiatric Research*. 2008;42(7):515–520. doi: 10.1016/j.jpsychires.2008.01.017
3. Kwapis JL, Jarome TJ, Schiff JC, Helmstetter FJ. Memory consolidation in both trace and delay fear conditioning is disrupted by intra-amygdala infusion of the protein synthesis inhibitor anisomycin. *Learning & Memory*. 2011;18(11):728–732. doi: 10.1101/lm.023945.111
4. Kozlovsky N, Kaplan Z, Zohar J, et al. Protein synthesis inhibition before or after stress exposure results in divergent endocrine and BDNF responses disassociated from behavioral responses. *Depression and Anxiety*. 2008;25(5):E24–E34. doi: 10.1002/da.20366
5. Rudy JW, Huff NC, Matus-Amat P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2004;28(7):675–685. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.09.004

AUTHORS' CONTACT INFO

* T.A. Zamorina; address: 1-12 Leninskiye Gory street, 119234 Moscow, Russian Federation; e-mail: motorina1814@mail.ru