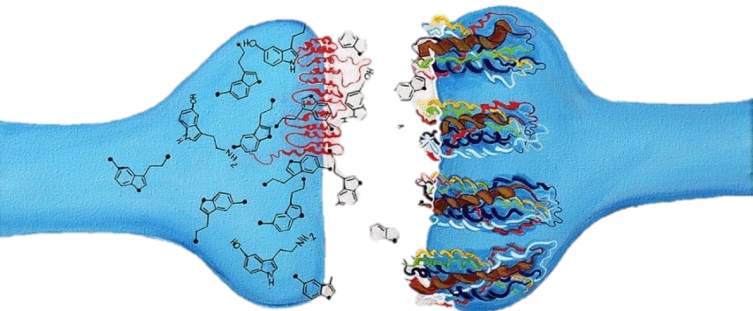




Мухаметшина Регина
Дилюсовна

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕРТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ У КРЫС



Научный руководитель:
доц., канд. биол. наук
Кравцова О.А.

Казань-2021

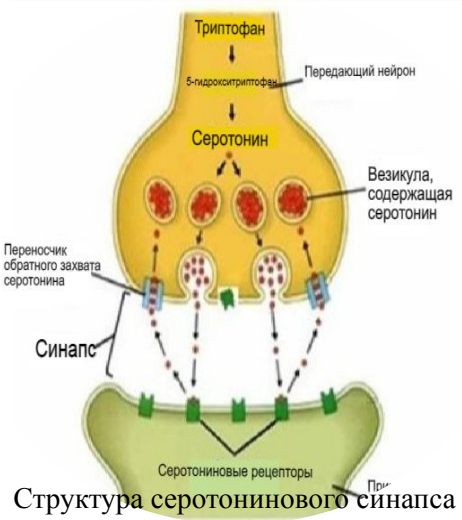
Актуальность

Показано, что острый и хронический стресс вызывает изменение уровня серотонина, посредством подавления *Trh*, изменения концентрации его переносчика *Slc6a4*, числа пре- и постсинаптических серотониновых рецепторов, что, первую очередь является факторами, детерминирующими предрасположенность к развитию депрессии и другим психическим расстройствам. Поэтому изучение экспрессия генов серотониновой системы является одним из новых биомаркеров, позволяющих оценивать общее состояние организма, прогнозировать возникновение некоторых заболеваний и их исходов.

Фермент *Trh* является фактором, ограничивающим скорость биосинтеза нейротрансмиссии 5-Ht, и играет ключевую роль в регулировании доступности, обмена и функции серотонина

***5-Ht4*-рецептор является метаботропным, при активации повышающим количество цАМФ в клетке, что в свою очередь запускает каскад реакций, ведущий к выбросу нейромедиатора.**

Особое значение в правильном функционировании СТС имеет инактивация высвобожденного *5-Ht*, где функционирует транспортер обратного захвата серотонина – *5-Htt*, являющийся продуктом гена *Slc6a4*. Относящийся к семейству белков-транспортёров моноаминов, осуществляющий обратный захват и транспорт серотонина из синаптической щели обратно в выделивший его пресинаптический нейрон.



Структура серотонинового синапса

Целью настоящей работы является изучение влияния различного вида хронического стресса (иммобилизации, физической нагрузки и комбинированного комплекса данных воздействий) в динамике через 3, 6 и 9 месяцев на изменение количества мРНК генов экспрессирующихся серотониновой системой.

Задачи:

1. Оценить изменения экспрессии генов Trh1 и Trh2, Htr4, Slc6a4 на вивальной модели крыс линии Wistar в 4-х группах в динамике:

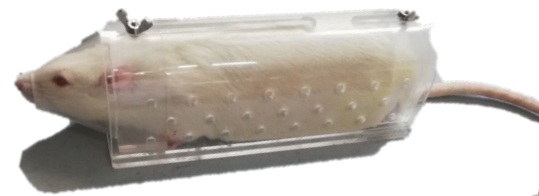
а) Контрольная группа



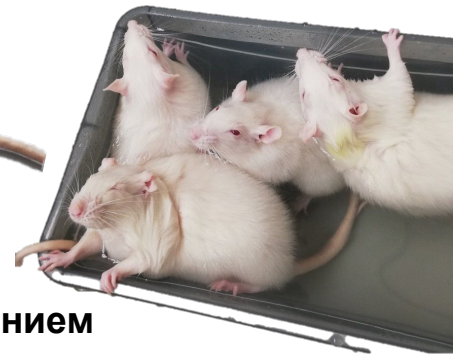
б) Группа с изнурительной физической нагрузкой «ФН»



в) Группа с иммобилизационным стрессом «ИС»




г) Группа с комплексом хронических стрессоров «ИС+ФН»



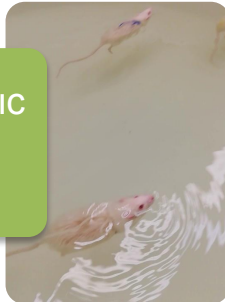
2. Оценить корреляционную зависимость между уровнем кортизола и изменением экспрессии генов СТ-системы.

3. Оценить изменения экспрессии генов Htr4, Slc6a4, Trh1 и Trh2 на вивальной модели крыс линии Wistar между группами «ИС» «ФН» «ФН+ИС» относительно группы контроля.


Методы. Работа с крысами




Разделили крыс на группы



Подвергали крыс действию стрессоров



Забирали кровь для анализа



Для моделирования воздействия различных типов хронического стресса сформировано 4 группы крыс линии Вистар в возрасте 6 месяцев, подвергавшихся разным видам стрессорного воздействия на протяжении 9 месяцев. Первая группа («Контроль») содержалась в обычных условиях вивария без воздействия какой-либо нагрузки.

Животные второй группы («ФН») испытывали стресс в виде интенсивной физической нагрузки (7 минут с грузом 8% от массы тела) в водном лабиринте Морриса (Open Science, Россия).

У животных третьей группы («Иммобилизационный стресс», «ИС») хронический стресс вызывался ежедневной 90- минутной иммобилизацией в специальном пенале-фиксаторе (Open Science, Россия) в течение 14 дней.

Четвертая группа («ФН+ИС») включала комплексную комбинацию стрессовой нагрузки путем теста вынужденного

Методы. Лабораторные работы

Относительный уровень экспрессии генов определяли на 3-й, 6-й и 9-й месяц эксперимента в образцах РНК, выделенных из венозной крови из хвостовой вены. Для синтеза кДНК использовали вырожденные праймеры. Относительный уровень экспрессии генов оценивали методом Ливака на основании результатов, полученных в ходе ПЦР в реальном времени. Корреляционную зависимость оценивали по коэффициенту корреляции Пирсона



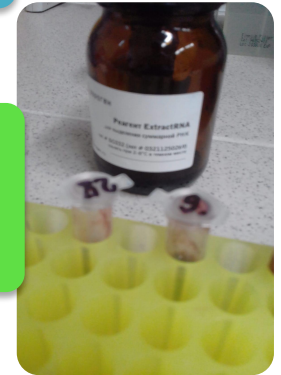
Выделяли РНК крови крыс (реагент ExtractRNA)



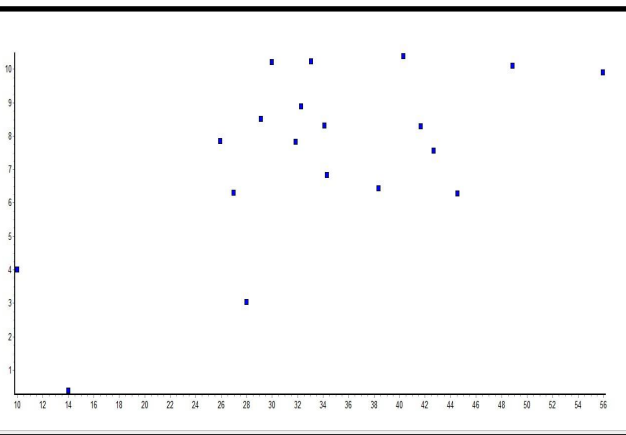
Синтезировали кДНК (использовали вырожденные праймеры с использованием MMLV RT kit)



Оценивали относительный уровень экспрессии генов методом 2- $\Delta\Delta C_t$ на основании результатов, полученных в ходе ПЦР

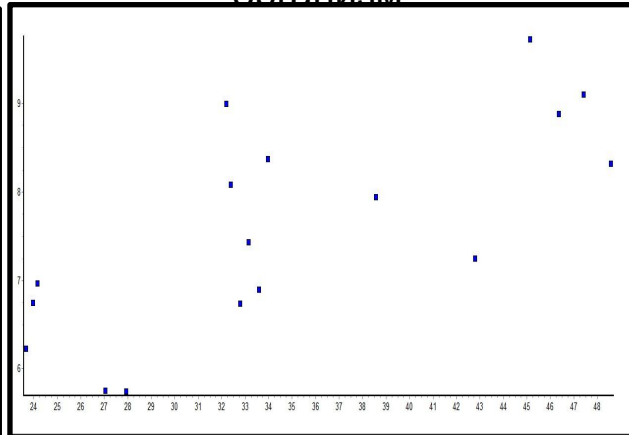


Обнаружили прямую корреляционную зависимость между уровнем глюкокортикоида и экспрессией *Slc6a4*(переносчика) , в зависимости от типа стрессора и его продолжительности воздействия на организм



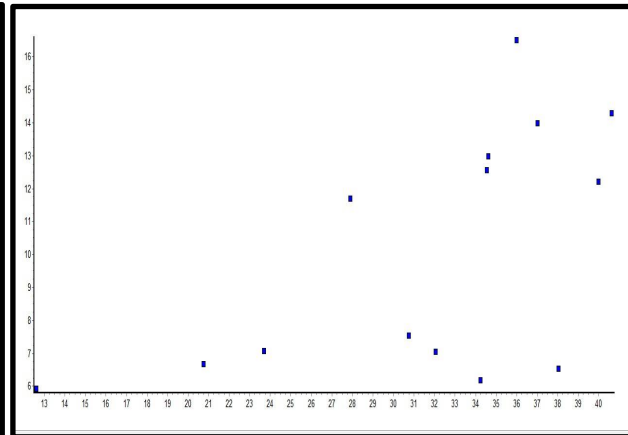
FN

Зависимость наблюдали на протяжении 6 месяцев эксперимента



FN+ИС

Зависимость наблюдали на протяжении 3 месяцев эксперимента



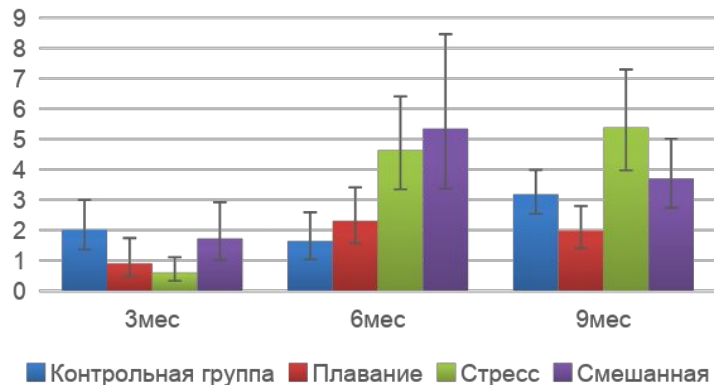
ИС

Зависимость наблюдали на протяжении 3 месяцев эксперимента

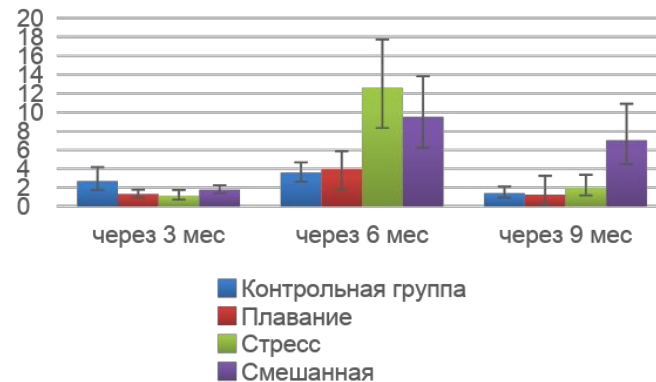
Корреляции между уровнем кортизола и экспрессией *Htr4* не обнаружили

В данном исследовании показано отсутствие экспрессии генов *Tph1* и *Tph2* в периферической крови крыс, тогда как для генов *Slc6a4* и *Htr4* показаны статистически значимые изменения относительных уровней их активности

Htr4 в динамике

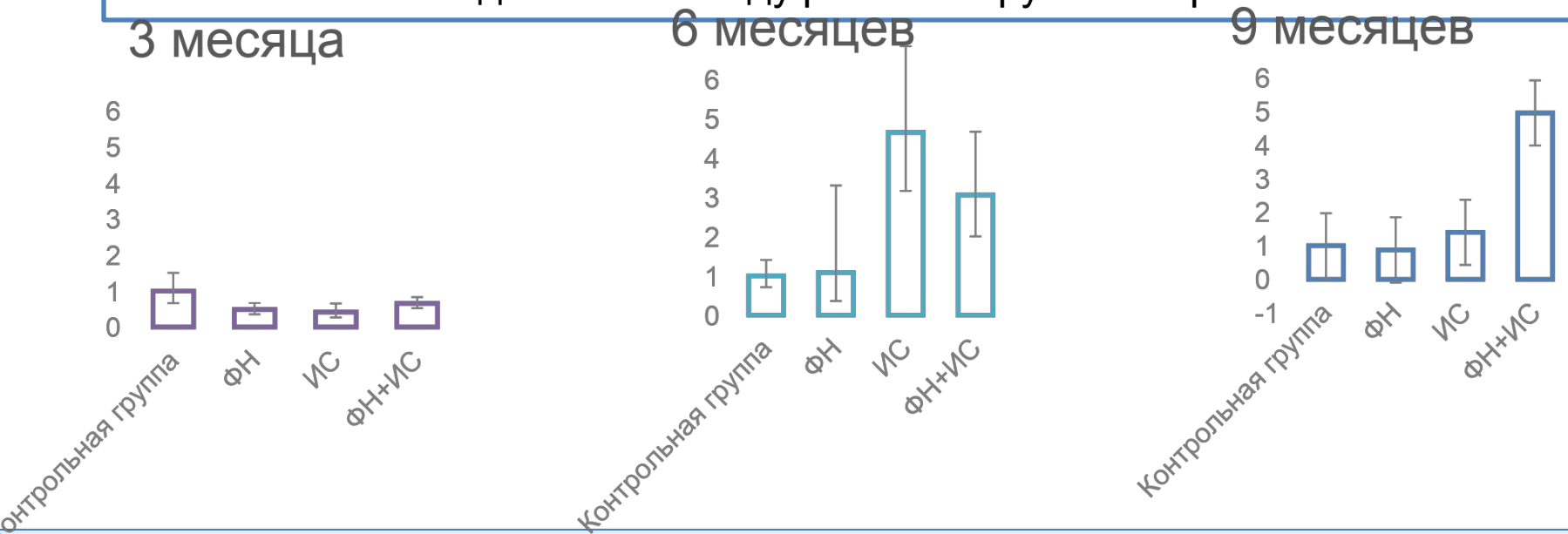


Slc6a4 в динамике



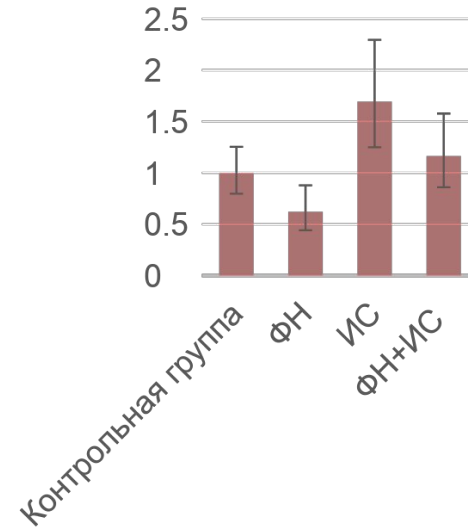
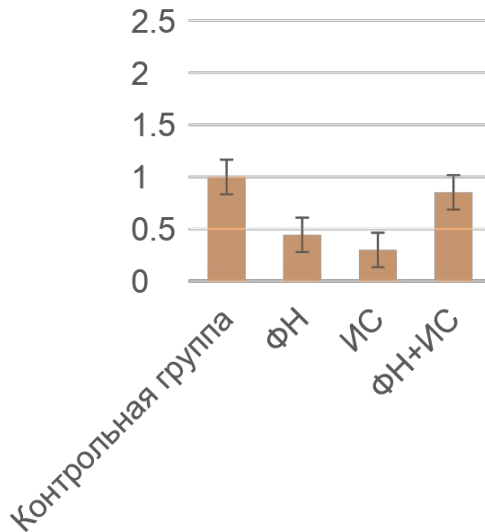
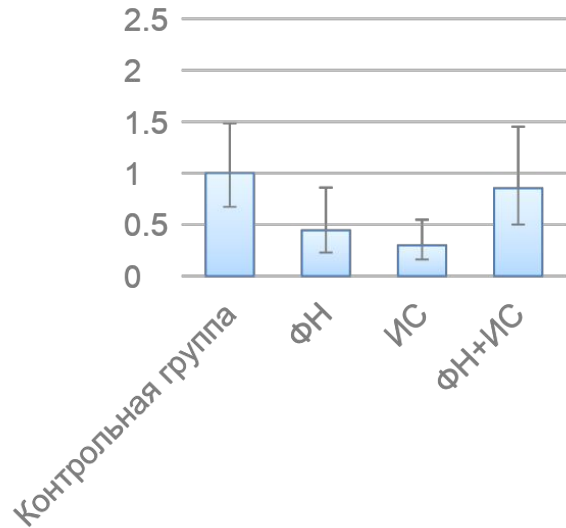
В динамике наблюдается тенденция к увеличению экспрессии генов *Htr4* и *Slc6a4* к 9 месяцу практически во всех группах, с пиком активности в 6ом месяце эксперимента, однако к 9 месяцу значение относительного уровня экспрессия *Slc6a4* вернулась к начальным значениям во всех группах, кроме группы «ИС+ФН», что может быть свидетельством адаптивных механизмов СТС

Относительный уровень экспрессии гена Slc6a4 после 3, 6 и 9 месяцев воздействий между разными группами крыс



В сравнении с контрольной группой после 3 месяцев воздействий стрессовых факторов на организм крыс можно наблюдать понижение относительного уровня экспрессии генов СТС во всех группах (в связи с чем с повышается риск развития депрессивноподобных состояний). При более долгом воздействии стрессоров (6 мес.) происходит повышение активности экспрессии во всех группах, кроме «плавцов», после 9 месяцев повышение уровня экспрессии можно наблюдать только у группы, наиболее сильно подверженной стрессорам – «ФН+ИС», тогда как и группа с ФН и группа с ИС сравняла уровень экспрессии с контрольной

Относительный уровень экспрессии гена Htr4 после 3, 6 и 9 месяцев воздействий между разными группами крыс



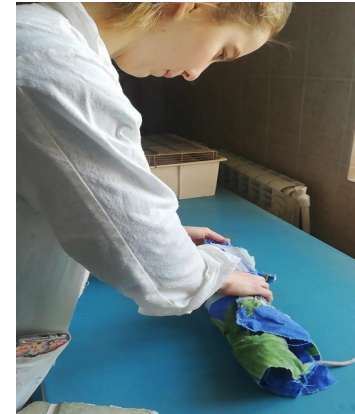
При изучении экспрессии рецепторного гена также наблюдается падение экспрессии во всех группах крыс после 3 месяцев эксперимента, но данная тенденция к падению активности экспрессии продолжается и к 6 месяцу. Однако, также как и с экспрессией переносчика серотонина более долгим воздействием (9 мес.) стрессоров происходит повышение активности экспрессии в группах с ИС – «ИС» и «ФН+ИС», тогда как и группа с ФН практически, произошло сравнение уровня экспрессии с КГ.

Выводы

1. На вивальной модели крыс линии Wistar показано значимое изменение активности экспрессии генов СТС, как в динамике (после 3, 6 и 9 месяцев эксперимента), так и между различными группами крыс. В данном исследовании показано отсутствие экспрессии генов Trp1 и Trp2 в периферической крови крыс, тогда как для генов Slc6a4 и Htr4 показаны статистически значимые изменения относительных уровней их активности. В динамике наблюдается тенденция к увеличению экспрессии генов Htr4 и Slc6a4 к 9 месяцу эксперимента, с небольшим падением активности после 3 месяцев эксперимента в группе с иммобилизационным стрессом и с комплексом стрессоров (физический и иммобилизационный стрессор), тогда как в контрольной группе и группе с физической нагрузкой значимых изменений не выявлено.
2. На вивальной модели крыс линии Wistar показано значимое изменение активности экспрессии генов СТС, как в динамике (после 3, 6 и 9 месяцев эксперимента), так и между различными группами крыс. В данном исследовании показано отсутствие экспрессии генов Trp1 и Trp2 в периферической крови крыс, тогда как для генов Slc6a4 и Htr4 показаны статистически значимые изменения относительных уровней их активности. В динамике наблюдается тенденция к увеличению экспрессии генов Htr4 и Slc6a4 к 9 месяцу эксперимента, с небольшим падением активности после 3 месяцев эксперимента в группе с иммобилизационным стрессом и с комплексом стрессоров (физический и иммобилизационный стрессор), тогда как в контрольной группе и группе с физической нагрузкой значимых изменений не выявлено.
3. Наиболее сильным изменениям экспрессии генов СТ системы в ходе проведения эксперимента относительно контрольной группы были подвержены группы крыс, где присутствует ИС-группы «ИС» и «ФН+ИС», наименьшим изменениям поддалась группа с изнурительной

Заключение

При аффективных расстройствах нарушаются адаптивные механизмы, а экспрессия генов, кодирующих серотониновые рецепторы, играет важную роль в адаптации, исследования экспрессии генов серотонергической системы на транскрипционном уровне является актуальной задачей, которую можно решить, используя адекватные животные модели аффективных расстройств



Благодарности

Большую благодарность выражаю своей сестре, без тебя я бы не справилась

