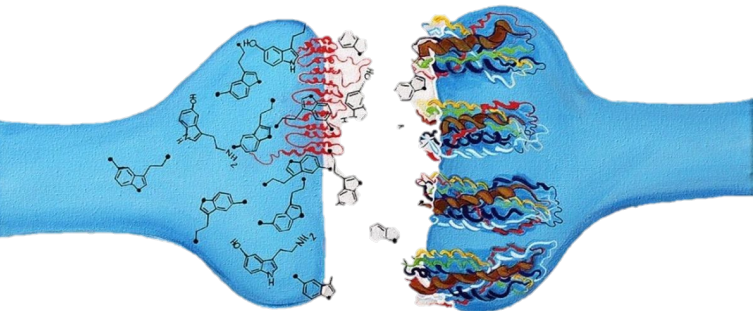




Мухаметшина Регина
Дилюсовна

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



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

Казань-2021

Актуальность

Серотонин участвует в формировании аффективных компонентов поведенческих актов, самообладания и эмоциональной устойчивости.

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.

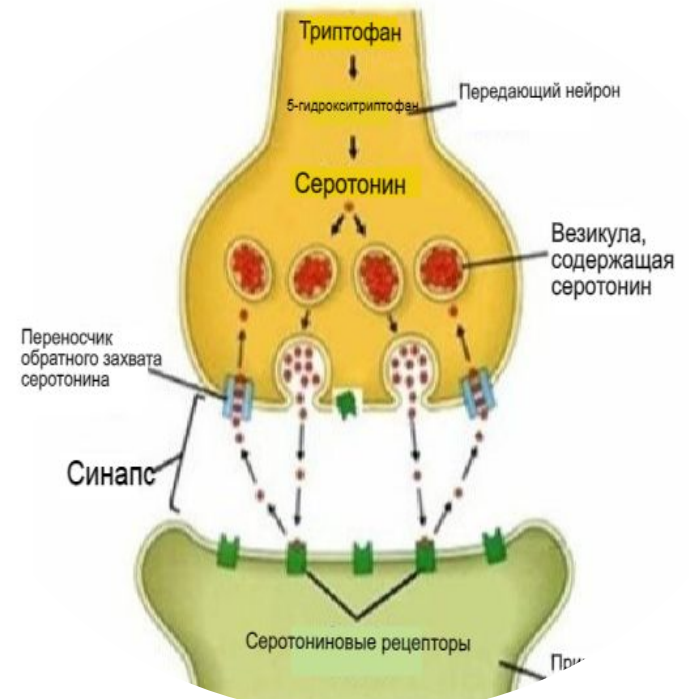


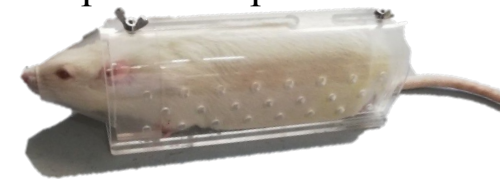
Рисунок 1. Структура серотонинового синапса

Целью настоящей работы является оценка влияния различных типов хронического стресса на изменение относительного уровня экспрессии ряда генов серотонинэргической системы у крыс линии Вистар.



Задачи:

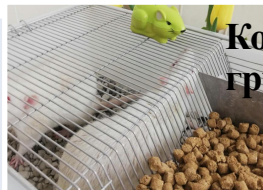
- 1) Определить относительный уровень экспрессии генов *Tph1*, *Tph2*, *Htr4* и *Slc6a4* на вивальной модели крыс линии Wistar, подвергавшихся различным видам хронического стресса (изнурительной физической нагрузке, иммобилизационному стрессу, комбинированному сочетанию данных стрессоров) и особей контрольной группы.
- 2) Оценить изменение уровня гормона кортизола в исследуемых группах как маркера хронического стресса.
- 3) Провести корреляционный анализ между уровнем экспрессии мРНК генов серотонинэргической системы и кортизолом в исследуемых группах.



Методы

Было сформировано 4 группы животных

Контрольная группа



N=21

Группа с физической нагрузкой



N=19

Группа крыс с гиподинамией



N=22

Группа с комплексной нагрузкой



N=26

Уровень кортизола в плазме определяли с помощью набора реактивов «Кортизол-ИФА-БЕСТ» фирмы «ВЕКТОР-БЕСТ».

Выделяли РНК крови крыс (реагент ExtractRNA)



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



Оценивали относительный уровень экспрессии генов методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ на основании результатов, полученных в ходе ПЦР

Amplification

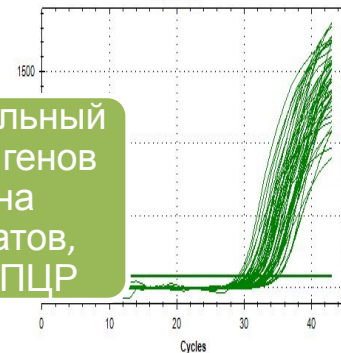


Рисунок 2. Кривая накопления Ct количественной ПЦР на ген *Htr4*.

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

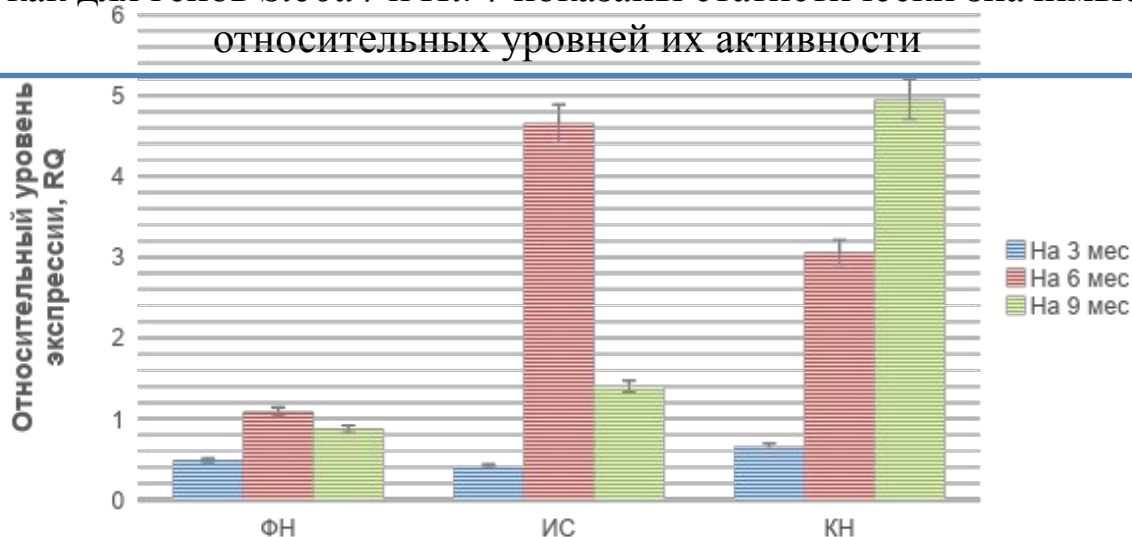
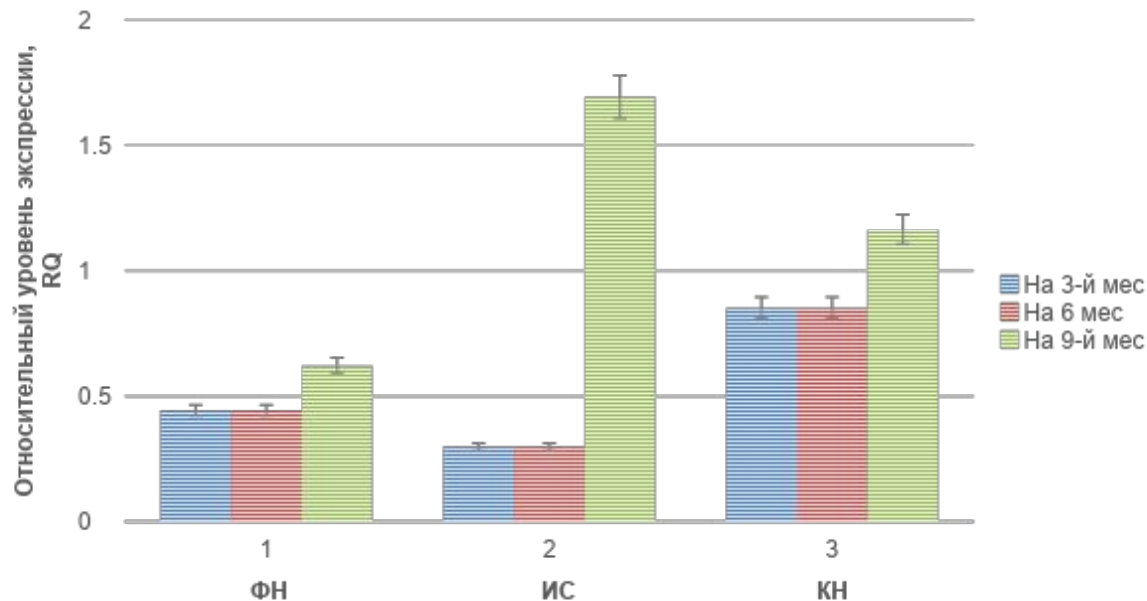


Рисунок 3. Сравнительный анализ RQ (относительного уровня экспрессии) гена *Slc6a4* после 3, 6 и 9 месяцев воздействий между разными группами воздействий стрессовых факторов относительно группы контроля

В сравнении с контрольной группой после 3 месяцев воздействий стрессовых факторов на организм крыс можно наблюдать понижение относительного уровня экспрессии гена *Slc6a4* 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 подверженных стрессорам – «КН», тогда как и группа с ФН и группа с ИС сравнивала уровень экспрессии с контрольной группой

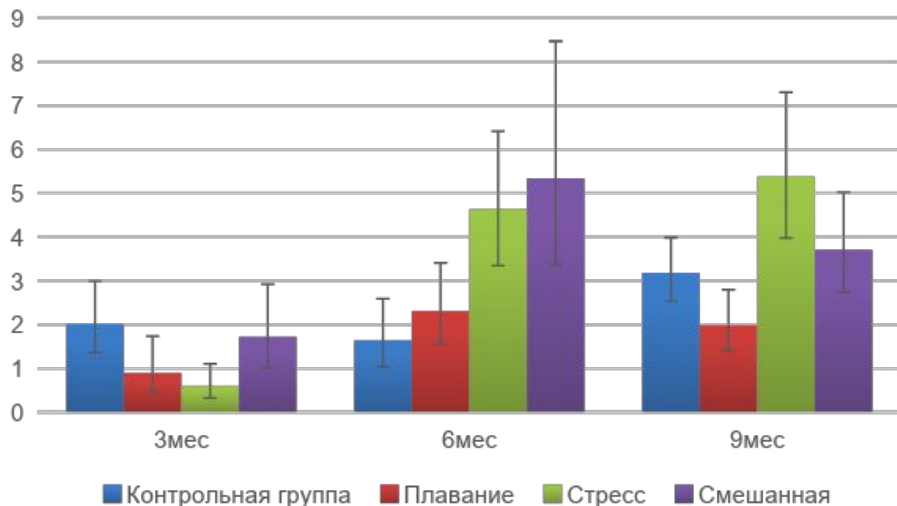
Относительный уровень экспрессии гена Htr4 после 3, 6 и 9 месяцев воздействий между разными группами крыс



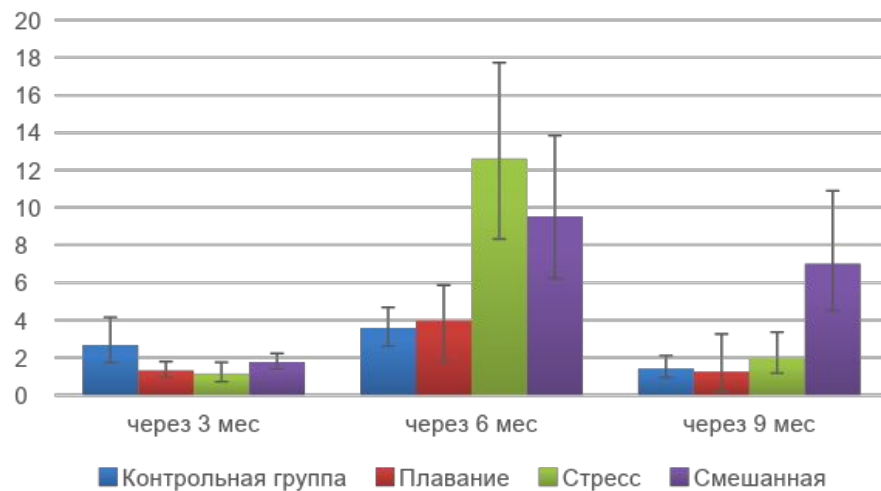
При изучении экспрессии рецепторного гена также наблюдается падение экспрессии во всех группах крыс после 3 месяцев эксперимента, но данная тенденция к падению активности экспрессии продолжается и к 6 месяцу. Однако, также как и с экспрессией переносчика серотонина более долгом воздействии (9 мес.) стрессоров происходит повышение активности экспрессии в группах с ИС – «ИС» и «КН», тогда как в группе «ФН» сохраняется тенденция к сниженной экспрессии

Относительный уровень экспрессии генов Htr4 и Slc6a4 в динамике

Htr4 в динамике



Slc6a4 в динамике



В динамике наблюдается тенденция к увеличению экспрессии гена Htr4 к 9 месяцу практически во всех группах, с пиком активности в 6ом месяце эксперимента, экспрессия гена переносчика серотонина также повышается к 6 месяцу, однако к концу эксперимента – к 9 месяцу значение относительного уровня экспрессия Slc6a4 вернулась к начальным значениям во всех группах, кроме группы «КН», что может быть свидетельством адаптивных механизмов СТС.

В данном исследовании установлено, что концентрация кортизола во всех исследуемых группах значительно снижается на 3-й месяц исследования с последующим сохранением результата

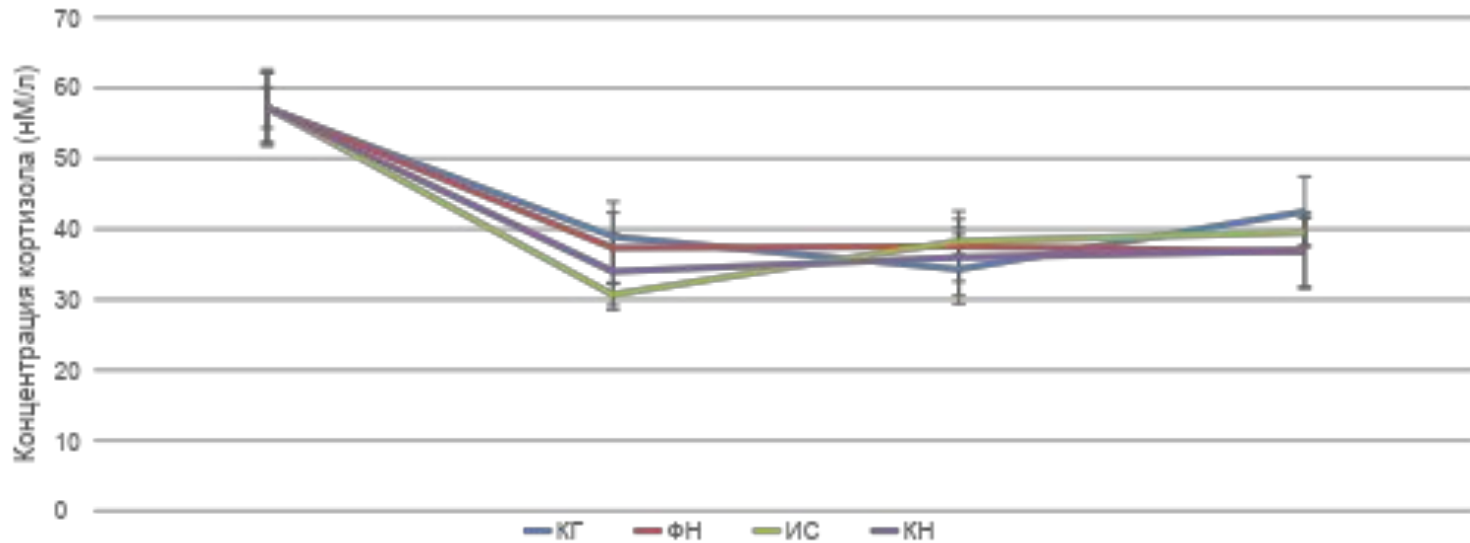


Рисунок 7. Изменение концентрации кортизола (нМ/л) в сыворотке крови у крыс разных групп в начале эксперимента и после воздействия стрессовых факторов

Изменение уровня кортизола наблюдается в общей группе крыс с понижением его уровня на 3 месяц исследования. Иммунизационный стресс вызывает больший дисбаланс в параметре концентрации кортизола, так как наблюдаются небольшие колебания концентрации данного гормона в группе ИС.

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

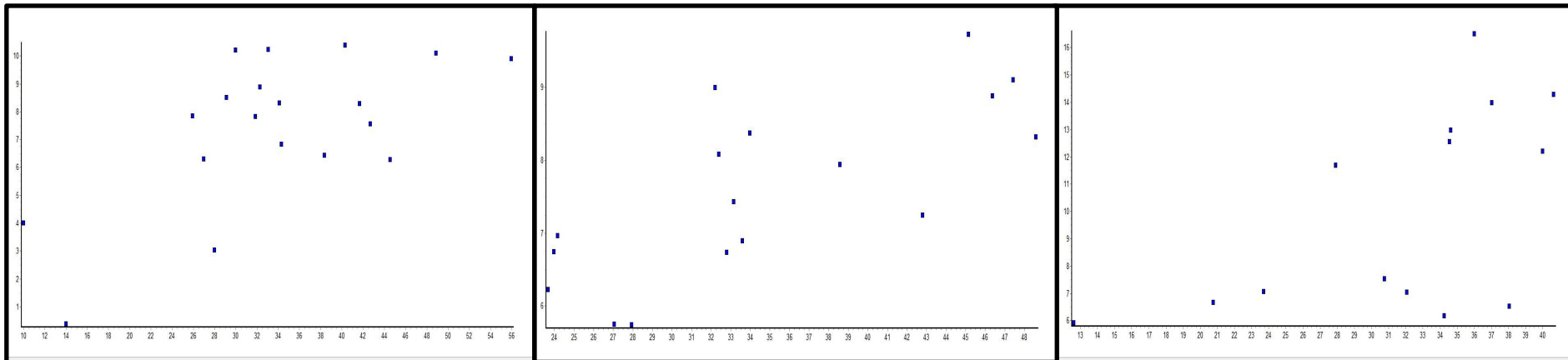


Рисунок 8, 9, 10 Корреляционная зависимость между уровнем кортизола и действием физических нагрузок на относительный уровень экспрессии генов серотониновой системы после воздействий стрессоров

ФН

Зависимость наблюдали на протяжении 6 месяцев эксперимента

ФН+ИС

Зависимость наблюдали на протяжении 3 месяцев эксперимента

ИС

Зависимость наблюдали на протяжении 3 месяцев эксперимента

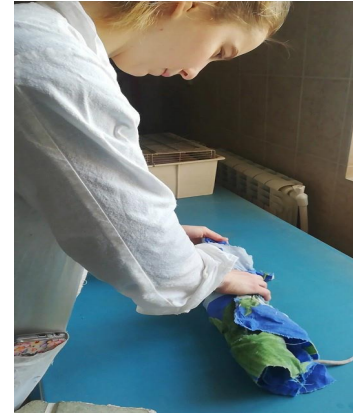
Корреляции между уровнем кортизола и экспрессией *Htr4* не обнаружили

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 Trh1 и Trh2 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 Trh1 и Trh2 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 серотонинергической системы на транскрипционном уровне является актуальной задачей, которую можно решить, используя адекватные животные модели аффективных расстройств



Благодарности



Благодарю весь коллектив кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии

Особую благодарность выражаю:

- Студенту, Мухаметшиной Альбине (без тебя я бы не справилась)
- Научной руководительнице, Ольге Александровне Кравцовой,
- Младшему научному сотруднику, ассистенту, Валеевой Елене Валерьевне