



БФУ имени
И. Канта

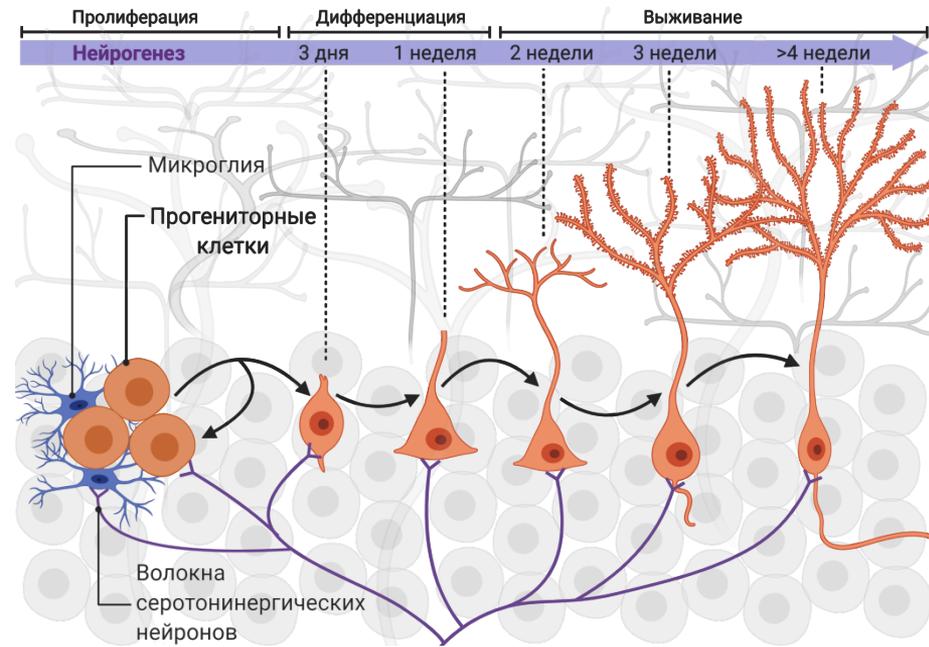
MDC MAX DELBRÜCK CENTER
FOR MOLECULAR MEDICINE
IN THE HELMHOLTZ ASSOCIATION

РОЛЬ СЕРОТОНИНА И МИКРОГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ГИППОКАМПА В ПЛАСТИЧНОСТИ МОЗГА

Туркин А.В.; Сидорова М.В.; Тучина О.П.; Аленина Н.; Клемпин Ф.

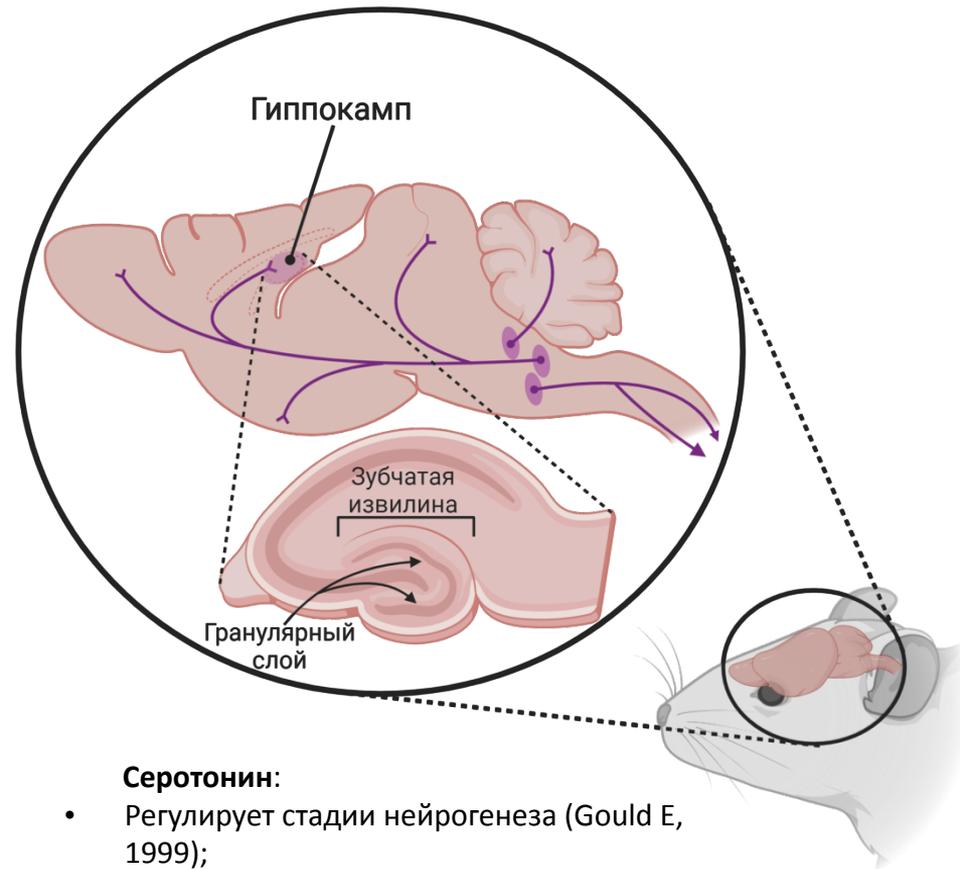
30.10.2020

Введение



Микроглия:

- Регулирует нейрогенез за счет фагоцитоза и синтеза цитокинов (Borsini, 2015; Kowiański P, 2018);
- Имеет рецепторы к серотонину (Krabbe G et al. 2012; Glebov K et al., 2015);
- ИГХ тканей мозга показала близкое расположение микроглии к серотонин содержащим синапсам (Etienne F et al., 2019)



Серотонин:

- Регулирует стадии нейрогенеза (Gould E, 1999);
- НСК имеют функциональные рецепторы к 5-HT (Banar M. et al, 2004; Klempin F, 2010)

Дизайн эксперимента

Крысы
WT и TRH2-/-
Самки и самцы



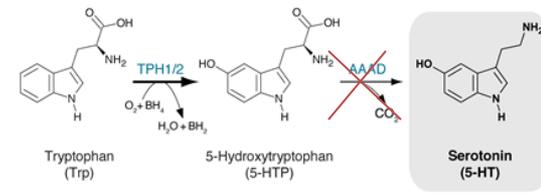
P8



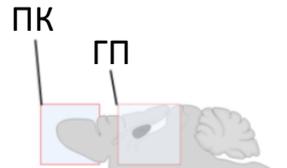
P21



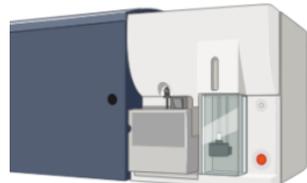
P56



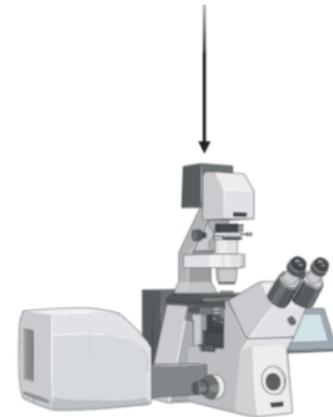
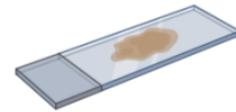
I. Определение 5-HT₂ и цитокинового профиля микроглии



Проточная цитометрия

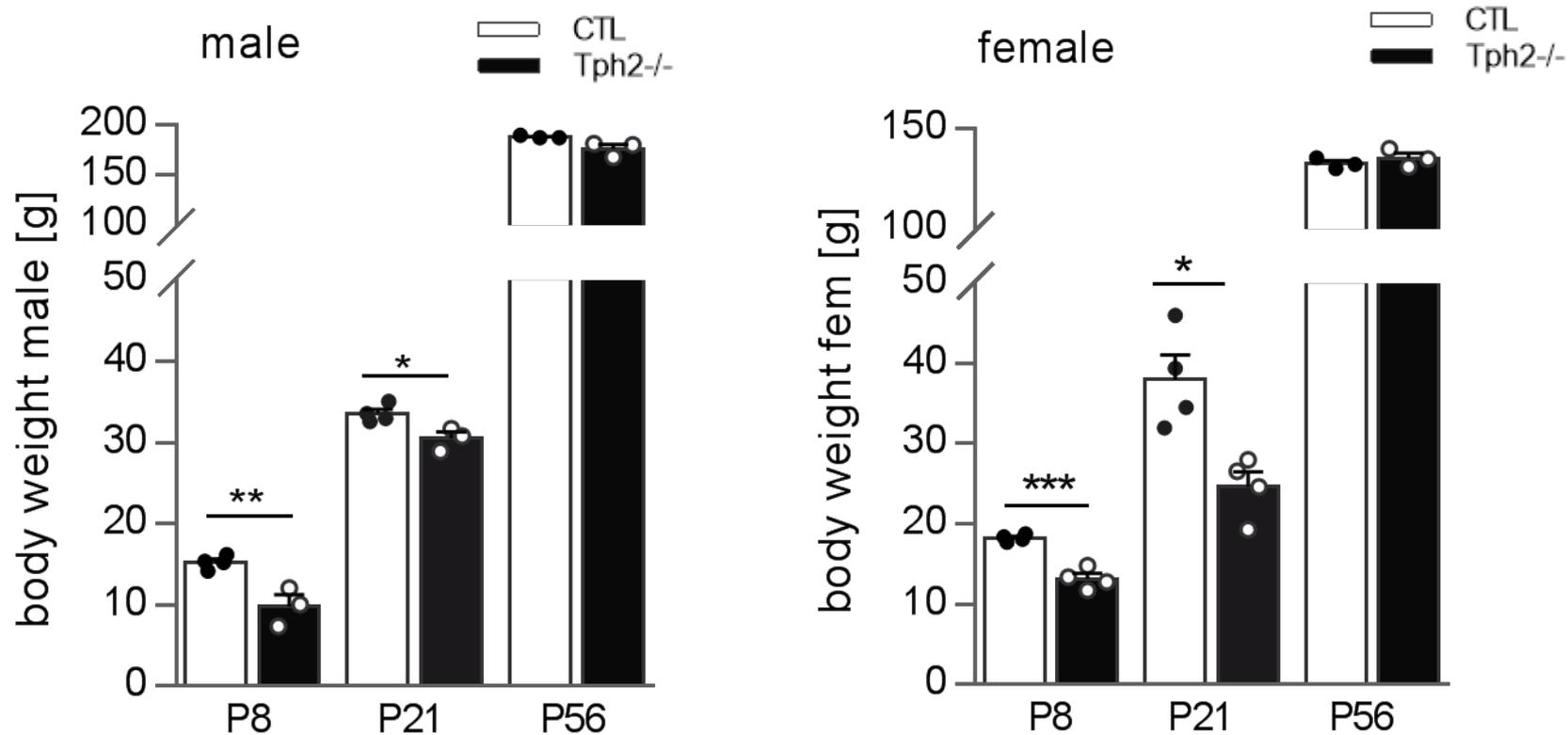


Микроглиальный сортинг (FACS)



Иммуногистохимия

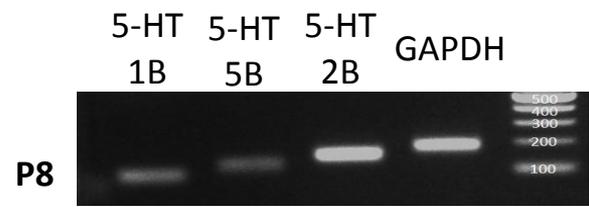
I. Различия в весе исследуемых WT и TRH2 животных



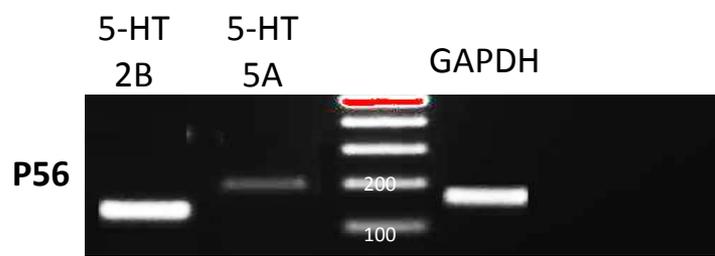
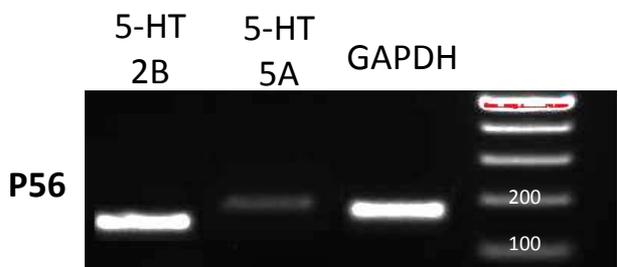
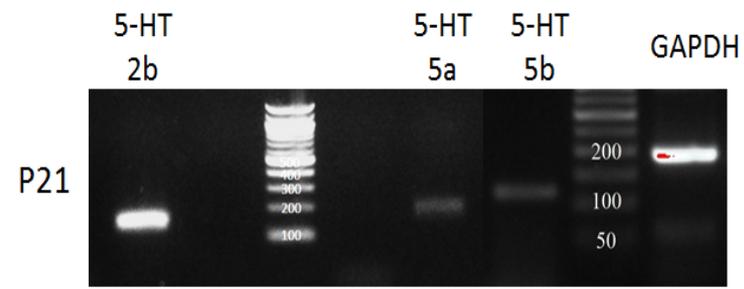
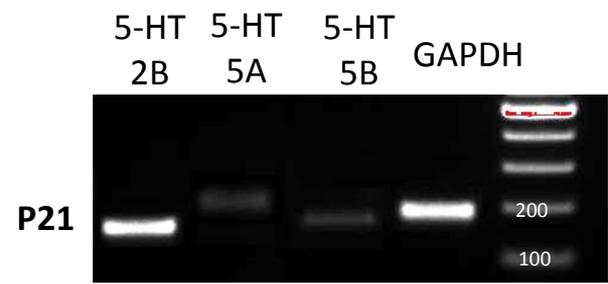
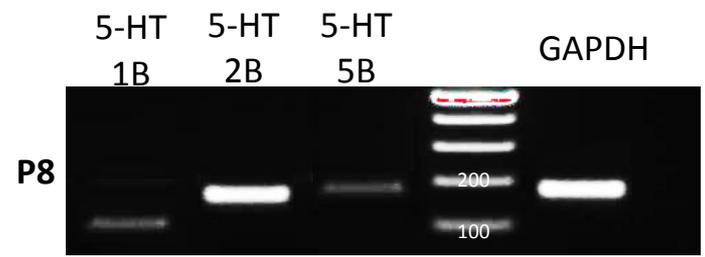
Бары отображают значения SEM (N=30); ns – отсутствие статистически значимых различий; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, **** - $p < 0,0005$

I. 5-HTRs микроглии полученной из гиппокампа WT крыс

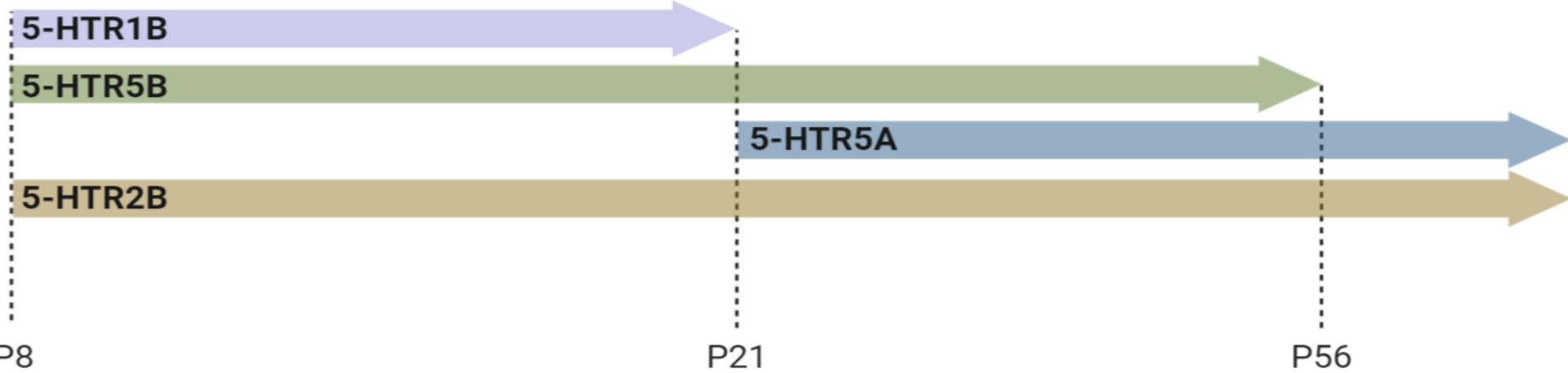
♂, ГП



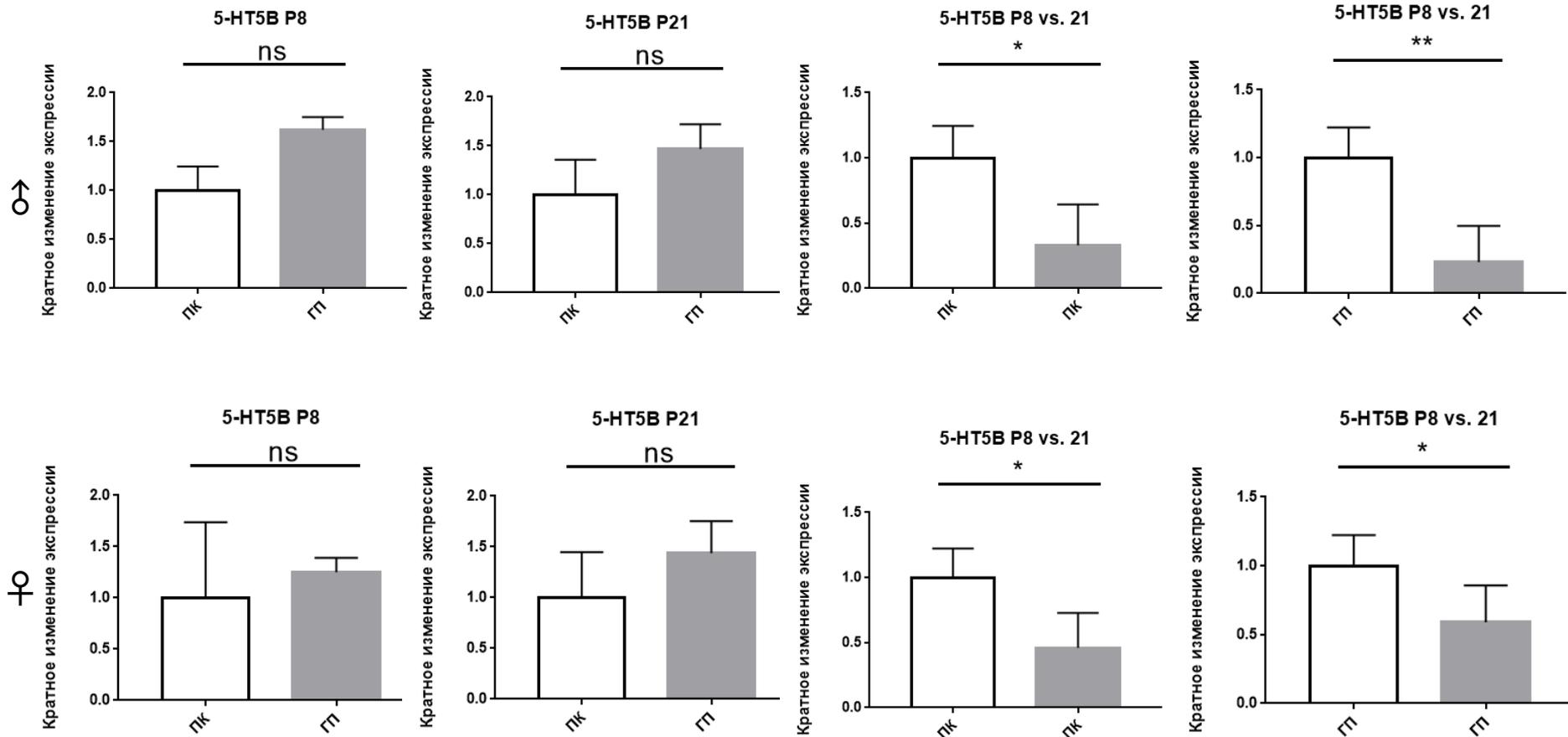
♀, ГП



I. Графическое представление экспрессии 5-HTRs микроглии в гиппокампе и префронтальной коре WT и KO животных

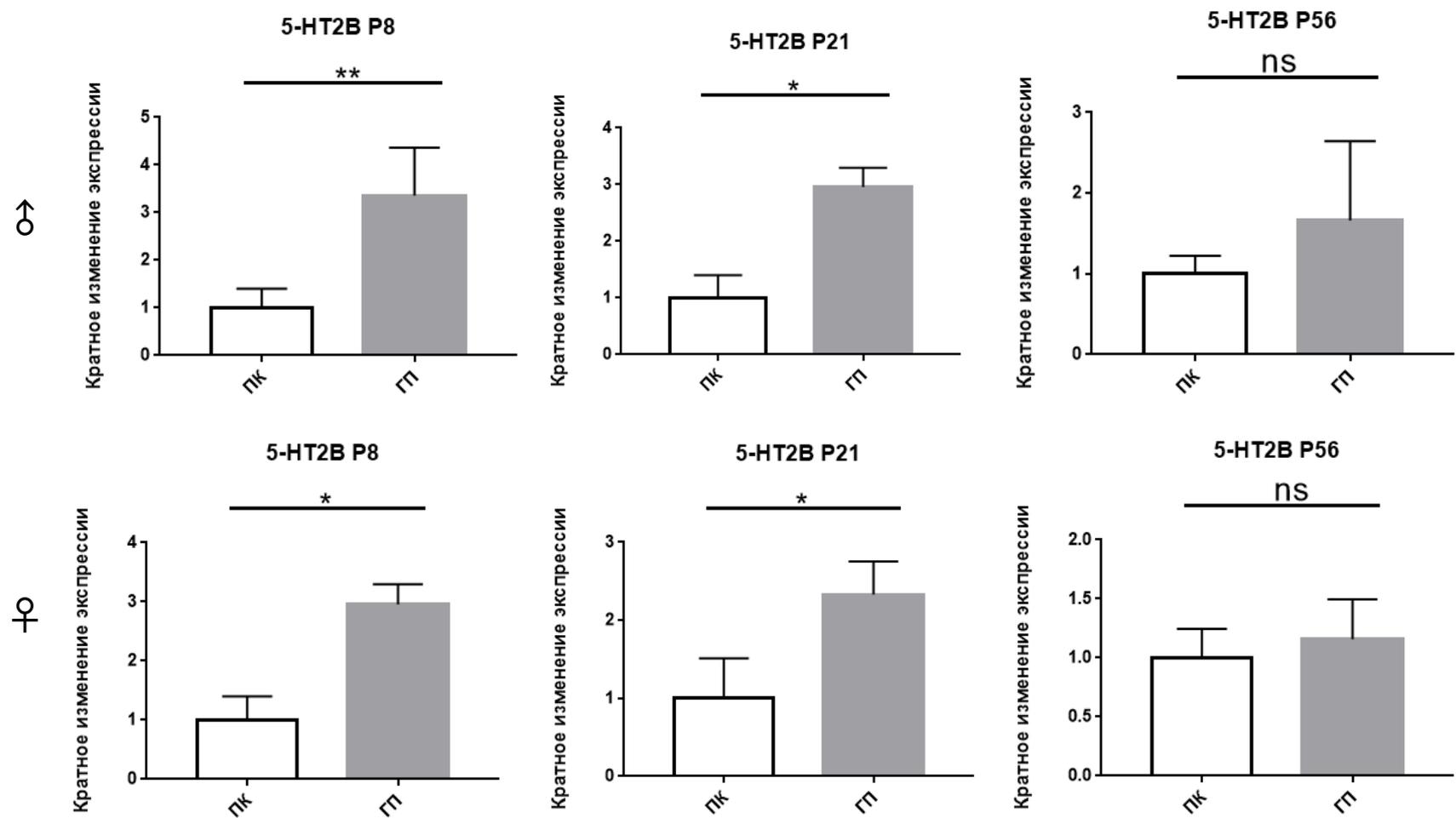


I. Различия в экспрессии 5-HT5B микроглии полученной из гиппокампа и префронтальной коры WT крыс



Бары отображают значения SEM (N=30); ns – отсутствие статистически значимых различий; * - p < 0,05, ** - p < 0,005

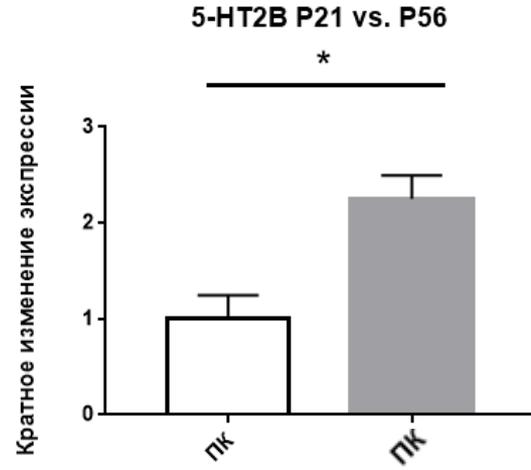
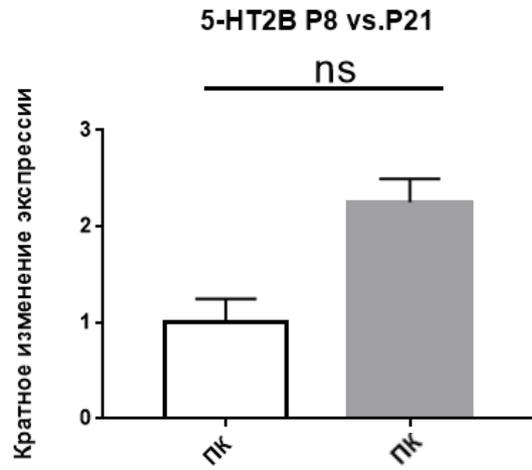
I. Различия в экспрессии 5-HT2B микроглии полученной из гиппокампа и префронтальной коры WT крыс



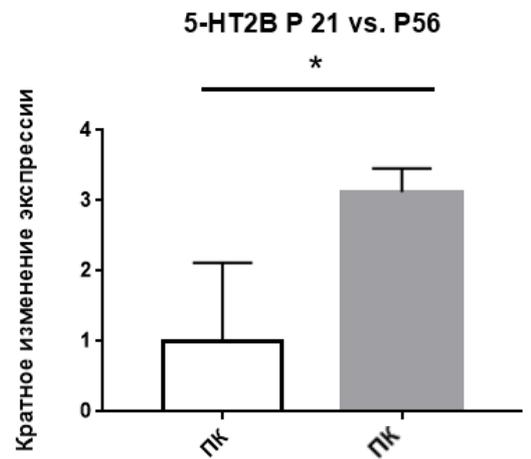
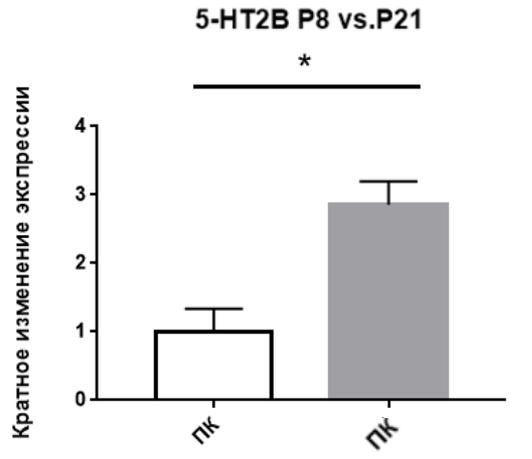
Бары отображают значения SEM (N=30); ns – отсутствие статистически значимых различий; * - p < 0,05, ** - p < 0,005

I. Различия в экспрессии 5-HT2B рецепторов микроглии WT крыс

♂

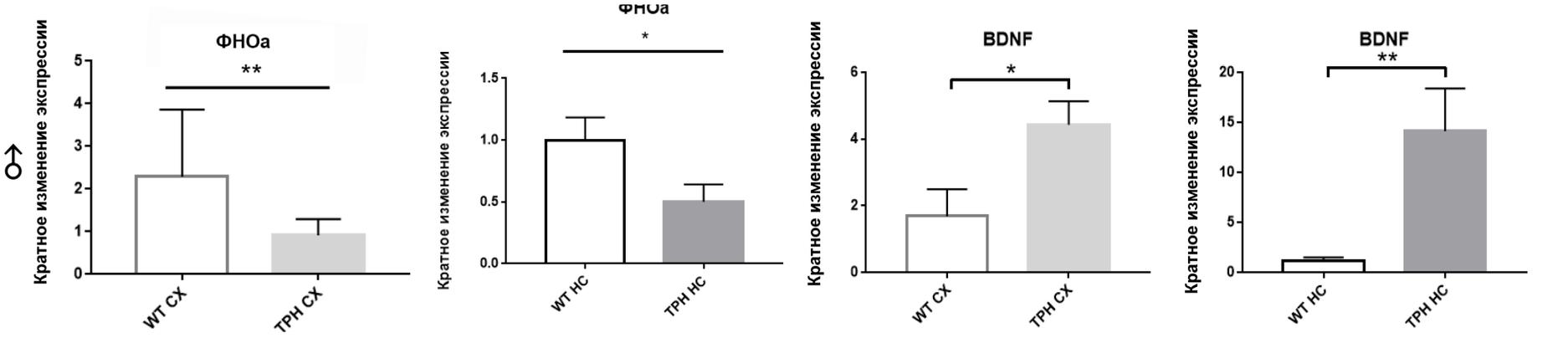
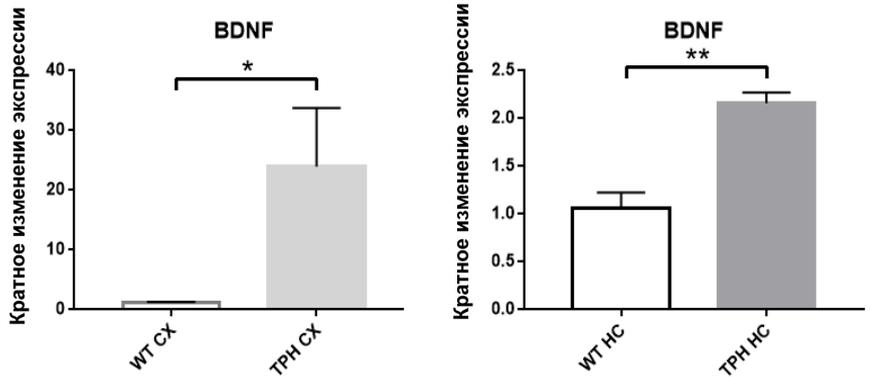
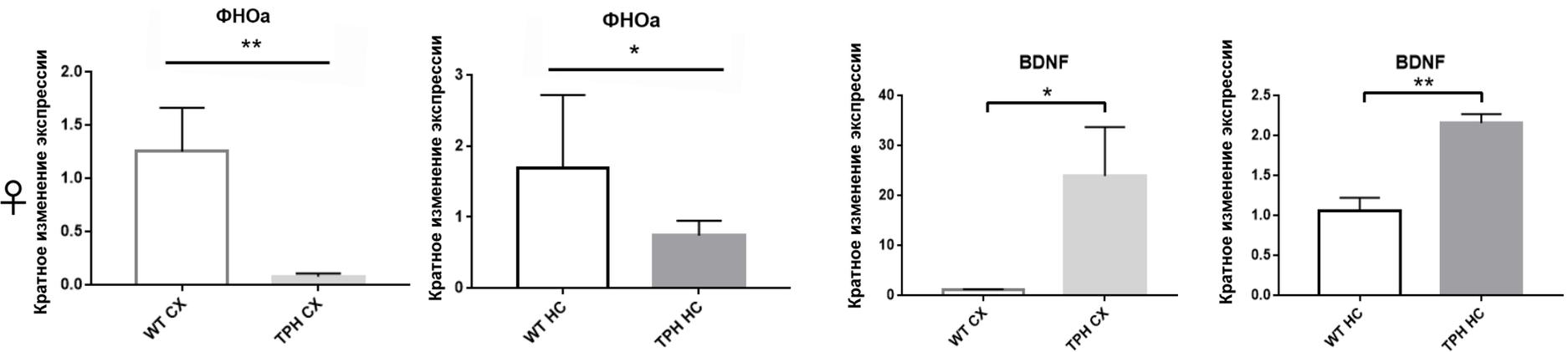


♀



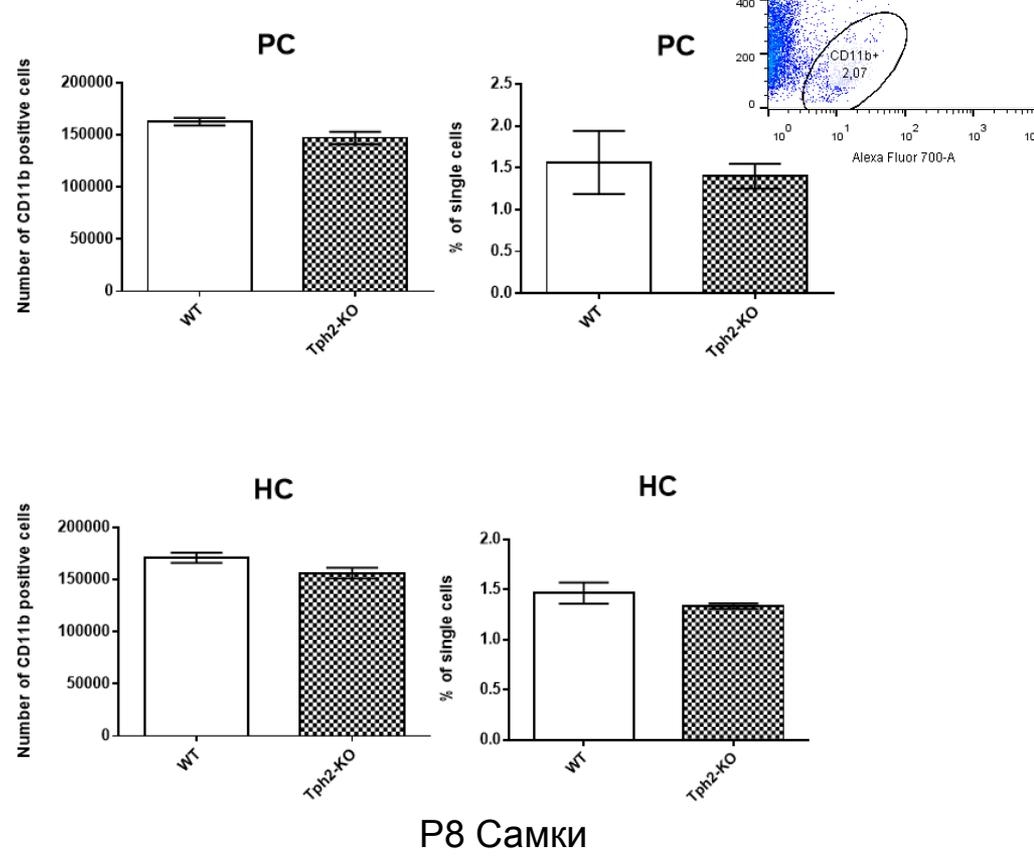
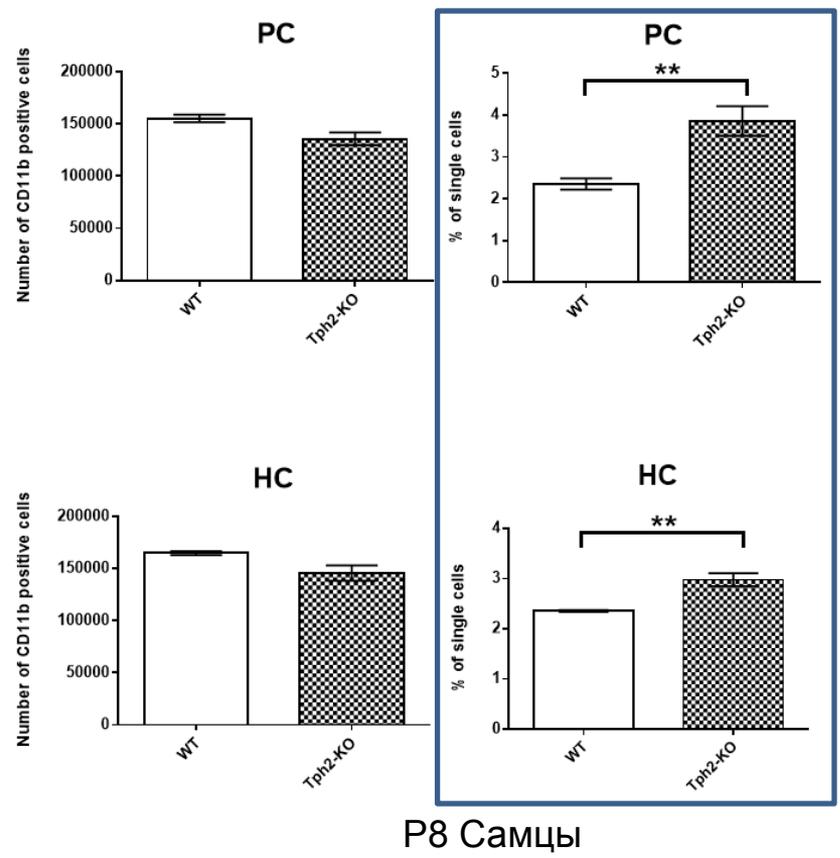
Бары отображают значения SEM (N=30); ns – отсутствие статистически значимых различий; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$

I. Цитокиновый профиль микроглии полученной из гиппокампа P21 КО крыс



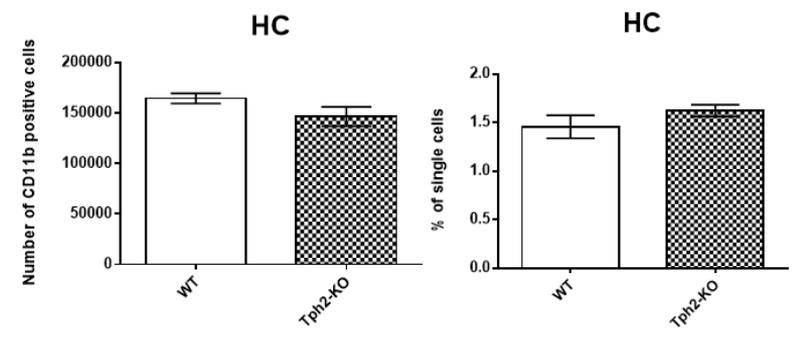
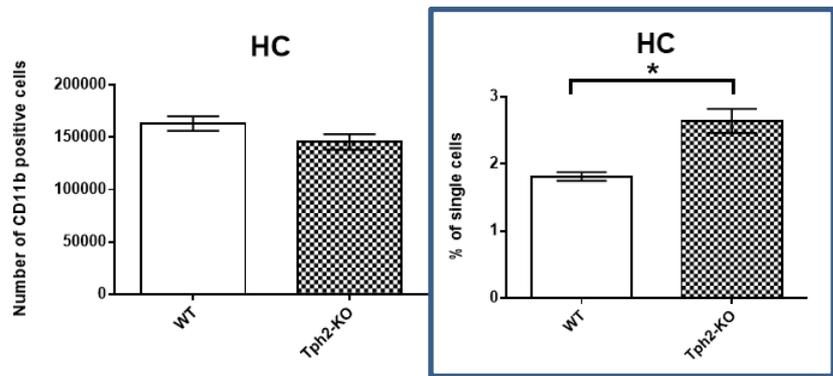
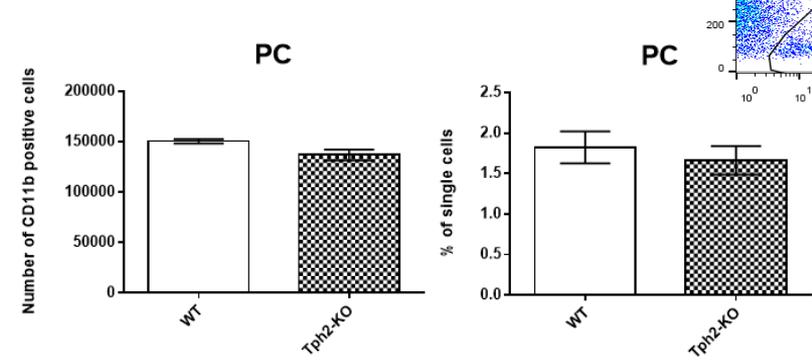
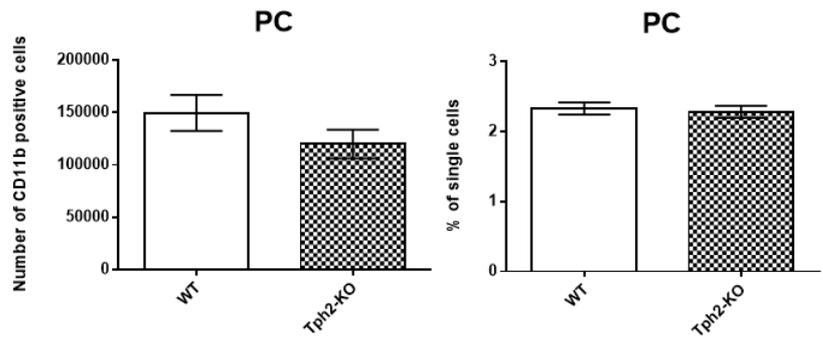
Бары отображают значения SEM (N=30); ns – отсутствие статистически значимых различий; * - p < 0,05, ** - p < 0,005

I. Количественный и процентный состав микроглии в гиппокампе WT и KO P8 крыс



Бары отображают значения SEM (N=30); ns – отсутствие статистически значимых различий; * - p < 0,05, ** - p < 0,005

I. Количественный и процентный состав микроглии в гиппокампе WT и KO P21 крыс

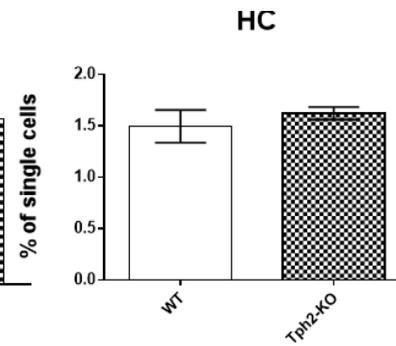
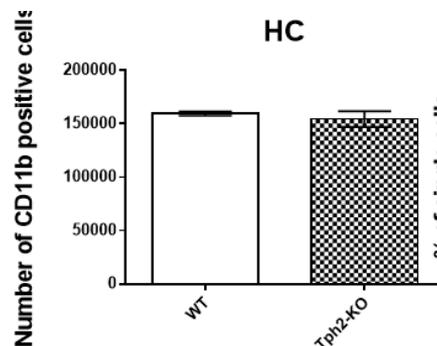
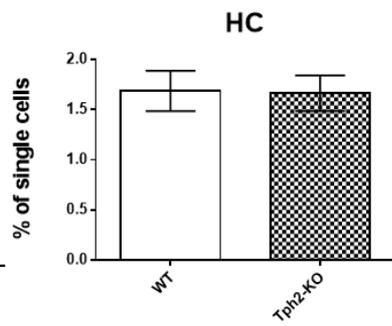
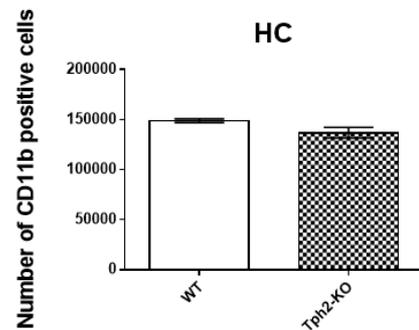
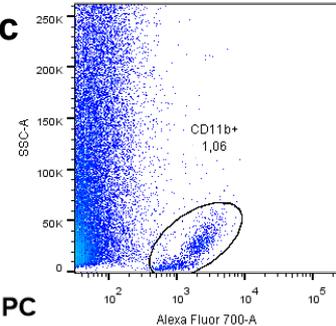
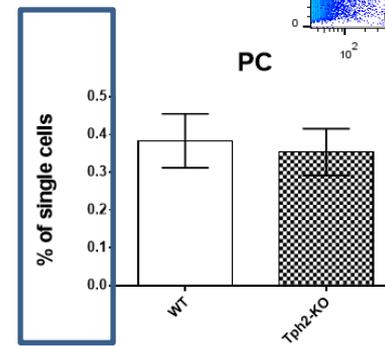
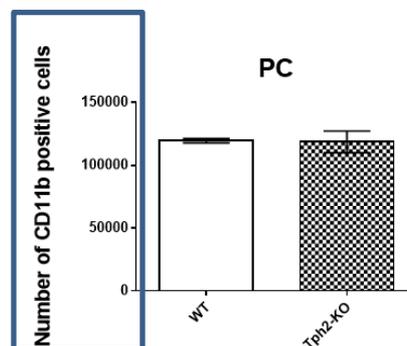
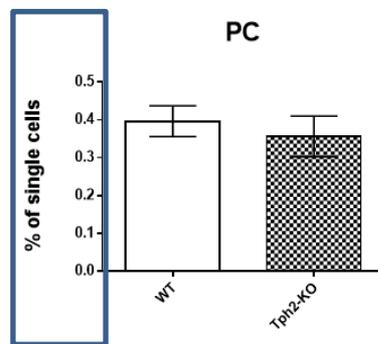
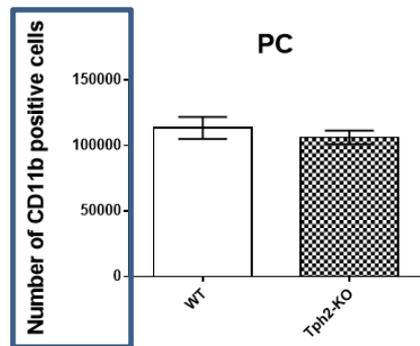


P21 Самцы

P21 Самки

Бары отображают значения SEM (N=30); ns – отсутствие статистически значимых различий; * - p < 0,05, ** - p < 0,005

I. Количественный и процентный состав микроглии в гиппокампе WT и КО P56 крыс

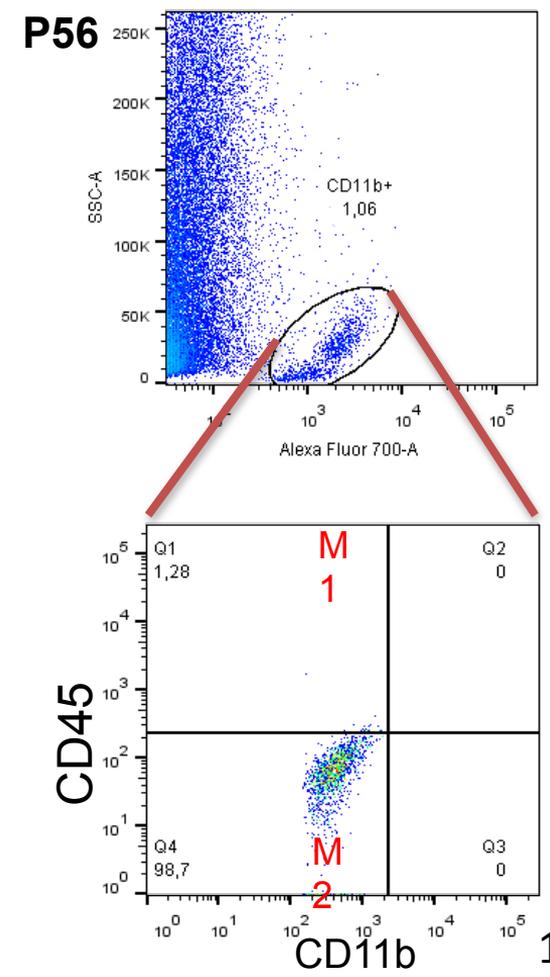
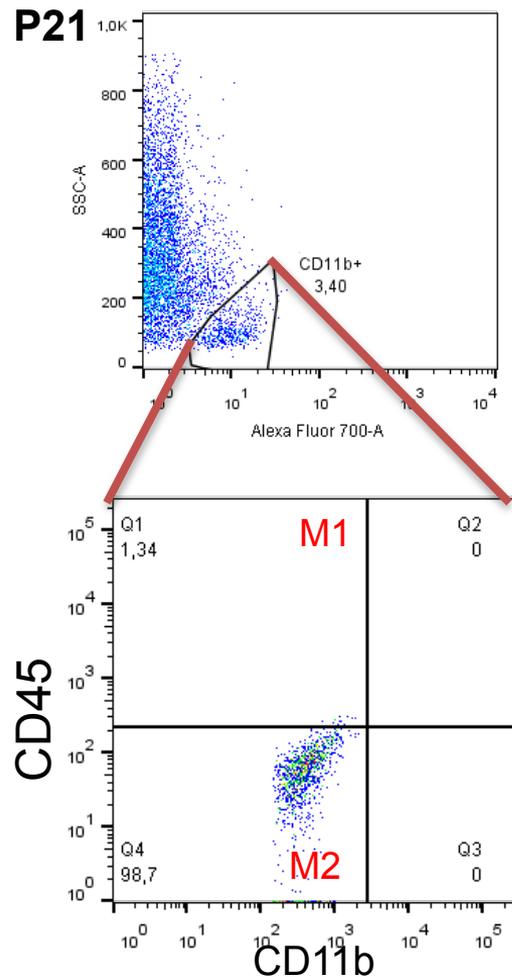
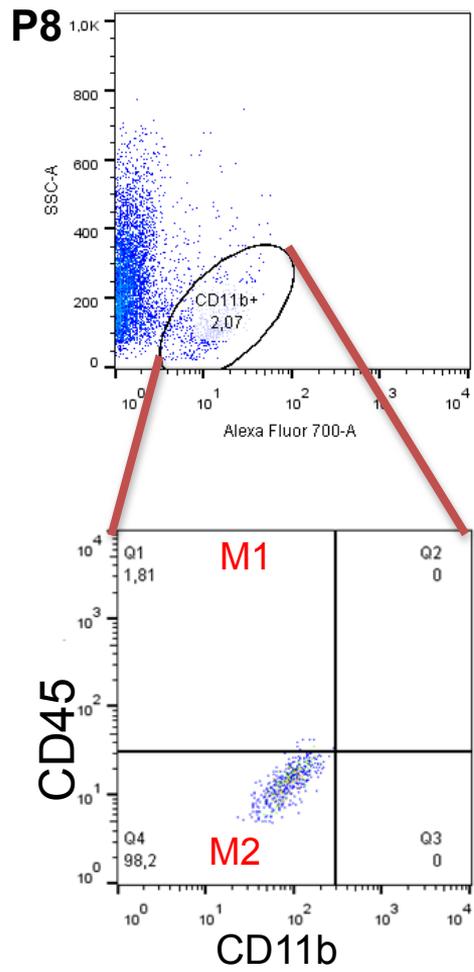


P56 Самцы

P56 Самки

Бары отображают значения SEM (N=30); ns – отсутствие статистически значимых различий; * - p < 0,05, ** - p < 0,005

I. M1 и M2 поляризация микроглии в гиппокампе КО крыс

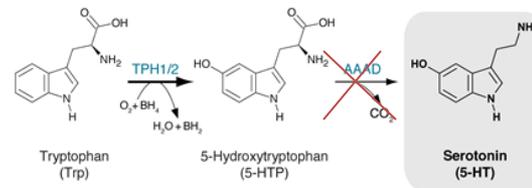
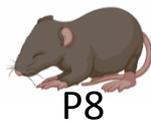


I. Выводы

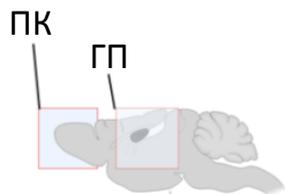
- Микроглия в гиппокампе и префронтальной коре головного мозга экспрессирует четыре подтипа 5-HT₁R: 1B, 2B, 5A, 5B;
- Наиболее сильно экспрессируемый 5-HT₁R на каждой из стадий развития является 5-HT₁R2B;
- Отсутствие серотонина не влияет на поляризацию и количество микроглиальных клеток в гиппокампе и префронтальной коре, но приводит к повышению уровня выделяемого микроглией BDNF и уменьшению ФНОα.

Дизайн эксперимента

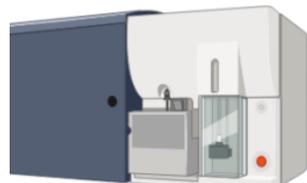
Крысы
WT и TRH2-/-
Самки и самцы



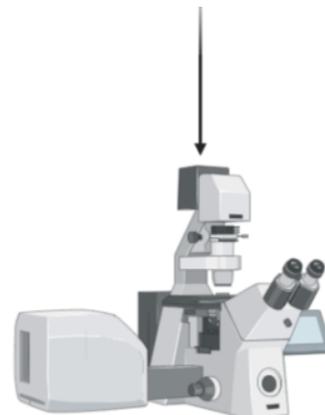
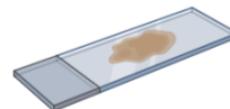
II. Иммуногистохимия и исследование кальциевой сигнализации



Проточная цитометрия

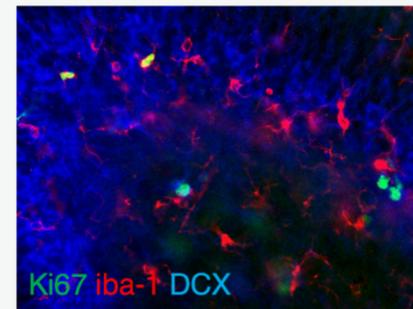
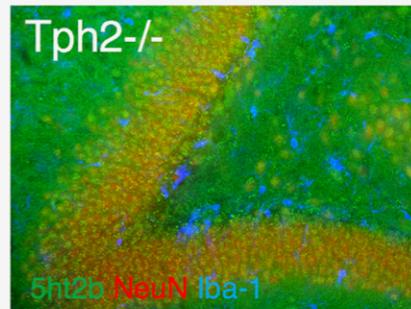
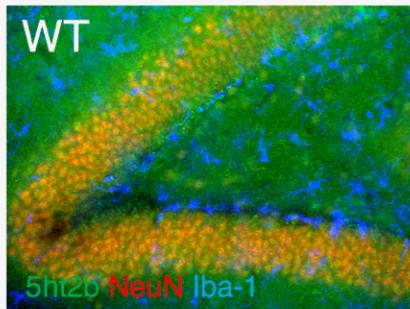
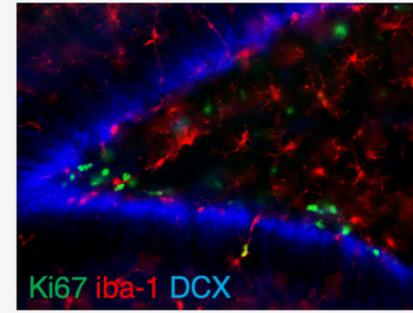
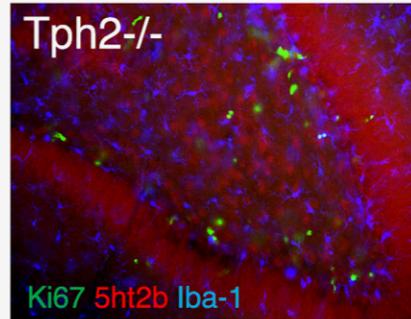
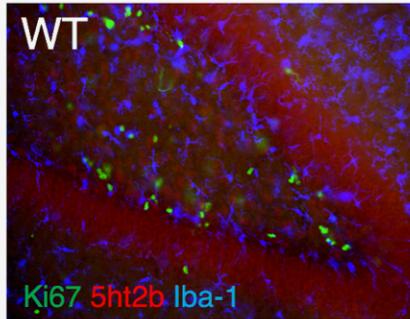
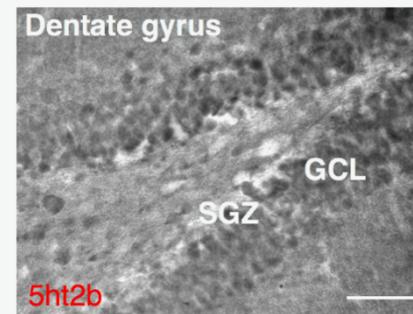
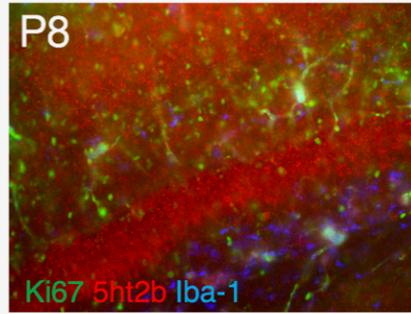
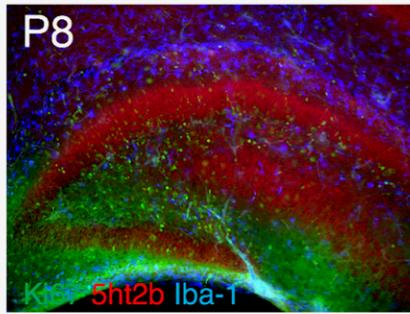


Сортировка микроглии

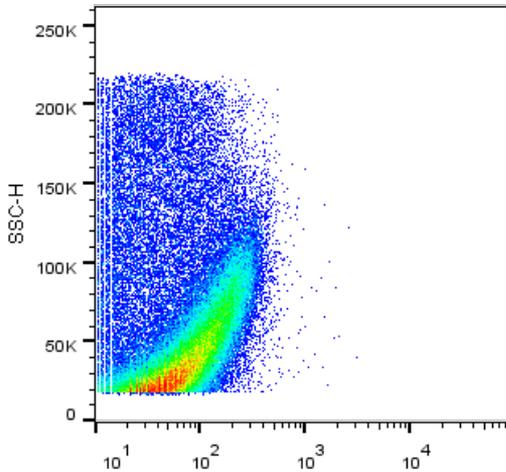


Иммуногистохимия

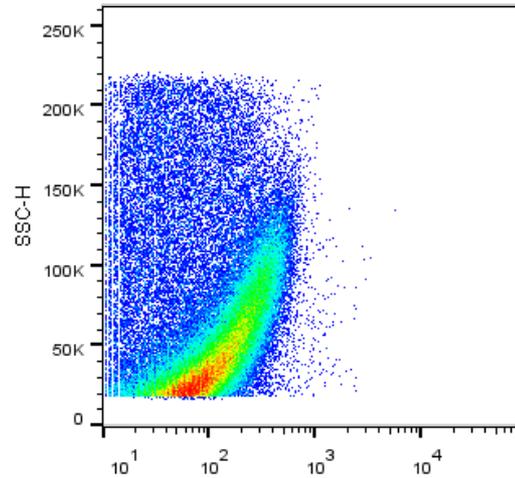
II. ИГХ анализ экспрессии 5-HT_{2b} в гиппокампе WT и КО P8 животных



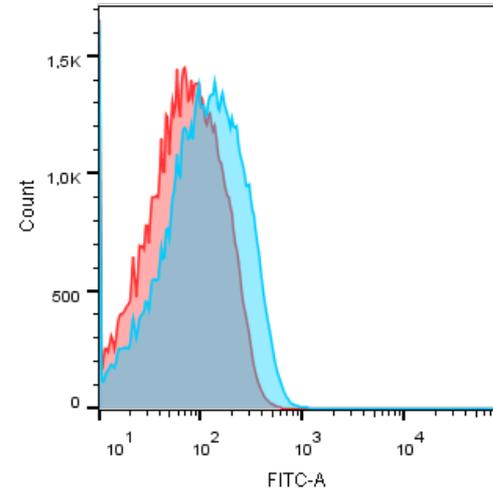
II. Исследование кальциевой сигнализации 5-HT_{2b} рецептора P56 животных



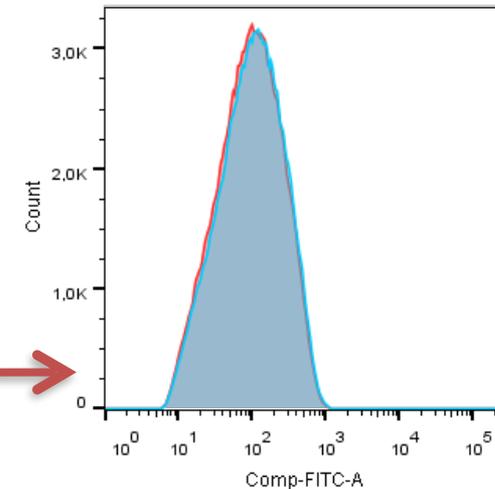
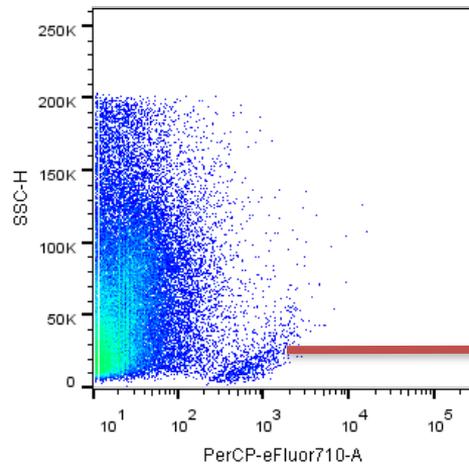
Контроль



25 мкМ 5-
гидрокситриптамин



Контроль
5-НТ



Контроль
5-НТ

II. Выводы

- Результаты ИГХ показали, что основной популяцией экспрессирующей 5-HT_{2B} являются прогениторные клетки зубчатой извилины гиппокампа;
- Серотонин и селективный агонист 5-HT_{2B} не вызывает изменений уровня внутриклеточного кальция в микроглиальных клетках.

ВЫВОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. ПЦР анализ микроглиальных клеток полученных методом клеточного сортирования из области гиппокампа и префронтальной коры головного мозга крысы в возрасте 8, 21, 56 постнатального дня показал наличие четырех подтипов 5-HTR: 1B, 2B, 5A, 5B. При этом наиболее сильно выраженным, в каждой возрастной группе, являлся подтип рецептора к серотонину 2B. В свою очередь, иммуногистохимический анализ не показал наличия 5-HT2B на поверхности микроглиальных клеток в области гиппокампа и префронтальной коры, однако, мы определили высокий уровень экспрессии исследуемого белка на поверхности нейрональных прогениторов в зубчатой извилине гиппокампа. Мы также не выявили изменений в опосредованном 5-HT2B уровнях кальция микроглиальных клеток в ответ на добавление 5-HT.

2. Используя генетически измененную модель животных с отсутствием серотонина в ЦНС, мы не обнаружили различий в поляризации и количественном соотношении микроглиальных клеток в исследуемых областях мозга, но на ранних стадиях развития (P8) процент микроглиальных клеток в гиппокампе был выше, чем у животных дикого типа, что может говорить о важности 5-HT в развитии других типов клеток головного мозга. Иммуногистохимический анализ не выявил, что отсутствие 5-HT влияет на стадии развития нейрональных прогениторов. Это может быть связано с повышенным уровнем экспрессируемого микроглиальными клетками BDNF и пониженным синтезом ФНОα.

Благодарность

