

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПОЯСНИЧНОМ УТОЛЩЕНИИ СПИННОГО МОЗГА И СЕДАЛИЩНОМ НЕРВЕ МЫШИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОГРАВИТАЦИИ

Шаймарданова Г.Ф.^{1,2}, Гайсин И.А.², Васильева А.Р.², Краснова Л.А.²

¹ Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН
ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, 420111, РФ; e-mail: gulnara-f-kzn@mail.ru

² ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России

ул. Бутлерова, 49, г. Казань, 420012, РФ

Поступила в редакцию: 09.07.2020

Аннотация. В работе дана характеристика транскрипционной активности генов *dlg4*, *mpz*, *anxa5*, *agrn*, *chat* в мотонейронах поясничного утолщения спинного мозга и седалищном нерве мышцы в условиях длительного (30 сут.) антиортостатического вывешивания в сравнении с контрольной группой, находившейся в обычных условиях вивария. Соответствующие белки играют важную роль в обеспечении структуры и проводимости периферического нерва. Выбранные гены, согласно результатам предыдущих исследований, увеличили уровень активности после 30-суточного пребывания в космосе. Организация модельного эксперимента на Земле позволила проследить динамику изменений в зависимости от длительности вывешивания, а также сравнить их проявления в нейронах поясничного утолщения спинного мозга и в седалищном нерве. По нашим данным, выделяется приблизительно двухнедельный период, в течение которого система пытается функционировать без радикальных перестроек своего метаболизма. По истечении этого периода включаются адаптационные механизмы, выражающиеся в резкой активации указанных генов (за исключением *mpz*).

Ключевые слова: антиортостатическое вывешивание, экспрессия генов, седалищный нерв.

Космический полет – одна из самых стрессовых ситуаций, с которыми сталкивается человек. В космосе человек подвержен радиации, гипогравитации, гиподинамии, испытывает изоляцию, оксигенацию, что нарушает систему гомеостаза и оказывает неблагоприятное воздействие на большинство функций организма. В результате воздействия невесомости формируется гипогравитационный двигательный синдром (ГДС), который включает в себя нарушения сенсорных систем, двигательных функций, функции мышц, гемодинамики. Но если мышечный аспект ГДС исследован всесторонне и подробно, то изменения в центральной и периферической нервных системах изучены недостаточно [1]. Первые исследования морфологии аксонов седалищного нерва мышцы в условиях разгрузки задних конечностей появились только в 2009 году [2]. Лишь относительно недавно получены существенные свидетельства того, что центральная нервная система играет ключевую роль в запуске и развитии ГДС [3, 4]. Однако конкретные механизмы этого влияния и источники адаптивных реакций со стороны периферической нервной системы остаются неясными. Имеющиеся данные показывают, что нарушения движений, силы и точности мышечных сокращений связаны с нарушениями «мышечного чувства» – ощущения положения частей собственного тела относительно друг друга и в пространстве, что указывает на вовлеченность в ГДС сенсорных нейронов. Информационные межклеточные взаимодействия в системе мотонейрон – скелетная мышца регулируют активность различных генов, определяющих морфофункциональные особенности обоих клеточных партнеров. Импульсная активность мотонейронов и нейрогенных молекул, секретируемых нервным окончанием, контролирует экспрессию генов в волокнах скелетных мышц. Мышцы, в свою очередь, синтезируют миогенные нейротрофические факторы, которые транспортируются в перикарион и стимулируют экспрессию определенных специфических генов в нервных клетках [5, 6]. Учитывая, что мРНК синтезируются в перикарионе мотонейрона, а затем через механизмы антероградного транспорта аксонов, распределенных по длине волокна, транспортируются в нервные окончания, можно предполагать, что изменения активности транскрипции мРНК и ее доставки в сайт трансляции могут быть патогенетическими звеньями ГДС.

В работе исследовали уровень транскрипционной активности генов *dlg4* (PSD95), *mpz* (P0), *anxa5* (Annexin V), *agrn* (Agrin), *chat* (Choline acetyltransferase) в поясничном утолщении спинного мозга и в смешанной ветви седалищного нерва мышцей опытной и контрольной групп на разных сроках антиортостатического вывешивания. Соответствующие белки играют важную роль в обеспечении структуры и проводимости периферического нерва. Организация эксперимента позволила проследить динамику изменений в зависимости от длительности вывешивания, а также дифференцировать эти проявления в зависимости от локализации в нейрональной или аксональной частях седалищного нерва.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на белых мышках самцах массой 25 ± 3 г ($n = 36$). Все процедуры с животными проводили в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского Национального комитета по биоэтике.

Животные были разделены на две группы: контрольную ($n = 9$) и опытную ($n = 27$). У животных подопытной группы моделировали гипогравитацию методом антиортостатического вывешивания задних конечностей [7]. Животных контрольной группы содержали в стандартных условиях вивария. Через определенные промежутки времени (3, 14, 21, 30 сут.) по три животных наркотизировали, перфузировали 4% раствором параформальдегида (рН 7,4). Для исследования выделяли седалищные нервы на уровне верхней трети бедра (большеберцовая и кожная ветви) и участок спинного мозга, соответствующий поясничному утолщению.

Расчет относительного уровня экспрессии целевых генов проводили на основе результатов ПЦР в реальном времени. Количественное содержание кДНК, соответствующей транскриптам целевых и референсных генов, оценивали в относительных единицах, сопоставляя значения порогового цикла реакции (Ct) для каждого образца с калибровочной кривой. Калибровочную кривую, отражающую зависимость увеличения значения порогового цикла реакции от уменьшения исходной концентрации ДНКмишени, строили на основании результатов ПЦР-реакций, в которых в качестве матрицы использовали серию разведений (1-, 10-, 100-, 1000 кратных) смеси образцов кДНК. Каждую реакцию проводили в двух аналитических повторностях. Определение уровня экспрессии целевых генов проводили относительно референсных генов *gapdh* и *rpl13a* (все значения даны в относительных единицах). При этом относительные значения количественного содержания кДНК, соответствующей транскриптам референсных генов, использовали для вычисления фактора нормализации. Фактор нормализации рассчитывали с помощью формулы $(P1 * P2)^{1/2}$, где P1 и P2 значения содержания транскриптов первого и второго референса соответственно. За уровень экспрессии принимали частное двух значений: 1) количественного содержания кДНК, соответствующей транскриптам целевого гена, и 2) фактора нормализации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование имело целью сравнить экспрессию целевых генов в динамике при моделировании гипогравитации на Земле. Для этого измеряли транскрипционную активность генов *dlg4* (PSD95), *mpz* (P0), *anx5* (Annexin V), *agrn* (Agrin), *chat* (Choline acetyltransferase) в поясничном утолщении спинного мозга и седалищном нерве мышей на различных сроках антиортостатического вывешивания. Выбранные гены, согласно результатам транскриптомного анализа спинного мозга [8], увеличили уровень активности после 30-суточного пребывания в космосе.

Результаты анализа транскрипционной активности целевых генов в поясничном утолщении спинного мозга мышей на различных сроках вывешивания приведены на рисунке 1а. Обращает на себя внимание немономонное поведение уровня экспрессии указанных генов. По сравнению с контрольной группой в первые две недели вывешивания имеется тенденция к уменьшению экспрессии некоторых генов. В частности, на 14-е сутки достоверно зафиксировано падение экспрессии генов, кодирующих XAT, PSD95 и белок миелина P0. На более длительных сроках наблюдается рост экспрессии большинства исследованных генов, за исключением *mpz* (P0), экспрессия которого осталась на низком уровне в пределах точности определения. Наиболее сильно возросла экспрессия *dlg4* (PSD95), *anx5* (аннексин V) и *agrn* (агрин).

При исследовании образцов седалищного нерва, характер изменения транскрипционной активности генов *mpz*, *dlg4* и *anx5* от времени эксперимента, в целом, оказался сходен с наблюдаемым в спинном мозге (Рисунок 1б). Зафиксировано устойчивое снижение активности генов *mpz* наряду с ростом активности *dlg4* (PSD95) и *anx5* (Annexin V) после двух недель вывешивания.

Белок PSD95 является скаффолдным белком, организующим пространственную структуру и активирующем работу каналобразующих белков и рецепторов. В периферическом нерве PSD95 распространен не только в постсинаптической области, но и на всем протяжении аксональной части седалищного нерва [9], где участвует в регуляции активности глутаматных рецепторов. Аннексин V участвует в экзо- и эндоцитозе, регуляции

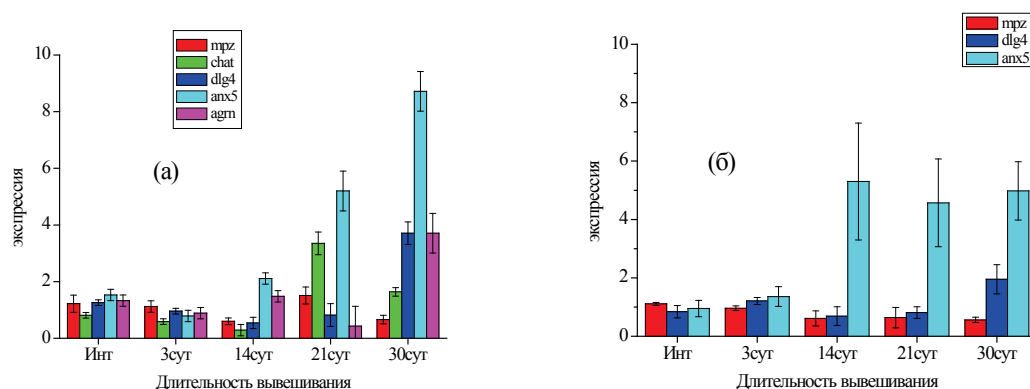


Рисунок 1. Уровень транскрипционной активности генов в (а) поясничном утолщении спинного мозга и (б) большеберцовой ветви седалищного нерва в мышей на различных сроках вывешивания по отношению к контролю

кальциевых каналов, сигнальных путях, воспалении, росте и дифференцировке клеток и апоптозе, в том числе в нейронах [10]. Агрин играет роль организатора синаптических контактов, участвует в регуляции воспалительных процессов, связываясь с рецепторами глутамата [11]. Кроме того, в волокнах седалищного нерва аннексин V и агрин локализованы на миелиновых оболочках, что указывает на возможную роль этих белков в функционировании миелина [12]. Рост транскрипционной активности этих генов на поздних сроках вывешивания может свидетельствовать об активации патологического процесса, о чем также свидетельствуют морфологические изменения нервных волокон [13].

В седалищном нерве мы не обнаружили достоверной амплификации генов *chat* и *agrn*. Причинами могут быть как отсутствие этих мРНК в волокнах седалищного нерва, так и погрешности, связанные с малым количеством ткани на фоне низкой экспрессии.

Исследование экспрессии генов в условиях невесомости является одной из ключевых задач для установления механизмов нарушений функционирования различных систем организма человека. Ранее при моделировании последствий гипогравитации на Земле у мышей [14] на 30-е сутки было показано подавление экспрессии 38 генов в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга, кодирующих миелинообразующие белки, белки каналов и насосов, ответственных за электрогенные свойства мембраны нервных клеток, снижение иммуноэкспрессии белков, принимающих участие в процессах синаптической передачи возбуждения: синаптофизина и PSD95, а также белков теплового шока *Hsp25* и *Hsp70*.

В аналогичном исследовании после 30-суточного космического полета [15-17] 134 гена показали достоверное увеличение и 41 ген - достоверное снижение экспрессии в материале поясничного отдела спинного мозга мышей. При этом спектр генов с измененной экспрессией в условиях реальной и моделируемой гипогравитации оказался разным, что указывает на различия в патогенезе ГДС, несмотря на сходство локомоторных нарушений.

В недавно опубликованной работе [8] проведен транскриптомный анализ в образцах седалищного нерва из того же полетного материала. Исследование выявило значительный пул генов (87), экспрессия которых увеличилась более чем в 32 раза при сравнении с мышами из контрольной группы. Изменилась экспрессия генов, имеющих отношение к состоянию метаболических и сигнальных путей, регуляции актинового цитоскелета, потенциал-зависимых кальциевых, натриевых и калиевых каналов, миелинизации нервных волокон.

Методы транскриптомного анализа позволяют охватить в целом обширную картину взаимодействия сигнальных и метаболических путей, вовлеченных в ГДС. Тем не менее, для изучения количественных соотношений и их динамики лучше приспособлены методы «ручного» ПЦР и иммуногистохимии. Результаты настоящей работы подтвердили, что на 30-е сутки антиортостатического вывешивания происходит активация генов *dlg4*, *anxa5*, *agrn*, *chat*, играющих важную роль в обеспечении структуры и проводимости периферического нерва. Организация эксперимента позволила также проследить динамику изменений в зависимости от длительности вывешивания, а также дифференцировать эти проявления в зависимости от локализации в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга либо в седалищном нерве. По нашим данным, изменение активности выбранных генов происходит качественно сходным образом в мотонейронах спинного мозга и в седалищном нерве. Выделяется приблизительно двухнедельный период, в течение которого система пытается функционировать без радикальных перестроек своего метаболизма. По истечении этого периода включаются адаптационные механизмы, выражающиеся в резкой активации указанных генов, за исключением *mpz* (P0), активность которого демонстрирует устойчивое снижение.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-04-01404).

Список литературы / References:

1. Цыбко А.С., Ильчибаева Т.В., Попова Н.К. Влияние космического полета на экспрессию генов в головном мозге экспериментальных животных. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2016, т. 20, № 2, с. 172-179. DOI: 10.18699/VJ16.134. [Cybko A.S., Il'chibaeva T.V., Popova N.K. Vliyanie kosmicheskogo poleta na ekspressiyu genov v golovnom mozge eksperimental'nyh zhiivotnyh. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii*, 2016, vol. 20, no. 2, pp. 172-179. (In Russ.)]
2. Canu M.-H., Carnaud M., Picquet F., Goutebroze L. Activity-dependent regulation of myelin maintenance in the adult rat. *Brain Research*, 2009, vol. 3, pp. 45-51.
3. Islamov R.R., Tyapkina O.V., Nikol'skii E.E., Kozlovskaya I.B., Grigor'ev A.I. The Role of Spinal Cord Motoneurons in the Mechanisms of Development of Low-Gravity Motor Syndrome. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2015, vol. 45, no. 1, pp. 96-103. DOI: 10.1007/s11055-014-0045-9.
4. Nagatomo F., Terada M., Ishioka N., Ishihara A. Effects of Exposure to Microgravity on Neuromuscular Systems: A Review. *Int. J. Microgravity Sci. Appl.*, 2014, vol. 31, no. 2, pp. 66-71.
5. Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С. Роль опорной афферентации в организации тонической мышечной системы. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, 2004, т. 5, с. 508-521. [Grigor'ev A.I., Kozlovskaya I.B., SHenkman B.S. Rol' opornoj afferentacii v organizacii tonicheskoy myshechnoj sistemy. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*, 2004, vol. 5, pp. 508-521. (In Russ.)]
6. Baguma-Nibasheka M., Fracassi A., Costain W. et al. Role of skeletal muscle in motor neuron development. *Histol. Histopathol.*, 2016, vol. 31, no. 7, pp. 699-719. DOI 10.14670/HH-11-742.

7. Morey-Holton, E.R., Globus, K., Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J. Appl. Physiol.*, 2002, vol. 92, pp. 1367-77. DOI: 10.1152/japplphysiol.00969.2001.
8. Kuznetsov M.S., Rezvyakov P.N., Lisyukov A.N., Gusev O.A., Nikolskiy E.E., Islamov R.R. Bioinformatic Analysis of the Sciatic Nerve Transcriptomes of Mice after 30-Day Spaceflight on Board the Bion-M1 Biosatellite. *Russian Journal of Genetics*, 2019, vol. 55, no. 3, pp. 388-392. DOI: 10.1134/S1022795419030104.
9. Chen T.-J., Kukley M. Glutamate receptors and glutamatergic signalling in the peripheral nerves. *Neural Regen Res.*, 2020, vol. 15, no. 3, pp. 438-447. DOI: 10.4103/1673-5374.266047.
10. Bouter A., Carmeille R., Gounou C., Bouvet F., Degrelle S.A., Evain-Brion D., Brisson A.R. Review: Annexin-A5 and cell membrane repair. *Placenta 36, Supplement 1, Trophoblast Research*, 2015, vol. 29, pp. S43-S49. DOI: 10.1016/j.placenta.2015.01.193.
11. Bolliger M.F., Zurlinden A., Lüscher D., Bütikofer L., Shakhova O., Francolini M., et al. Specific proteolytic cleavage of agrin regulates maturation of the neuromuscular junction. *J. Cell Sci.*, 2010, vol. 123, pp. 3944-3955. DOI: 10.1242/jcs.072090.
12. Shaymardanova G.F., Salnikov V.V. Localization of Annexin V and Agrin in the Intact Sciatic Nerve of Mice. *Neurochemical Journal*, 2020, vol. 3 (in press).
13. Rezvyakov P.N., Shaimardanova G.F., Lisukov A.N., Kuznetsov M.S., Islamov R.R., Nikolskiy E.E. Morphological Study of Myelinated Fibers of the Sciatic Nerve in Mice after Space Flight and Readaptation to the Conditions of Earth Gravity. *Doklady Biological Sciences*, 2018, p. 482. DOI: 10.1134/S0012496618050101.
14. Islamov R.R., Rizvanov A.A., Tyapkina O.V., Shenkman B.S., Kozlovskaya I.B., Nikolskiy E.E., Grigoryev A.I. Genomic Study of Gene Expression in the Mouse Lumbar Spinal Cord under the Conditions of Simulated Microgravity. *Doklady Biological Sciences*, 2011, vol. 439, pp. 197-200. DOI: 10.1134/S0012496611040107.
15. Islamov R.R., Gusev O.A., Tanabe A., Terada M., Tyapkina O.V., Petrov K.A., Rizvanov A.A., Kozlovskaya I.B., Nikolskiy E.E., Grigorjev A.I. Genomic Analysis of Mouse Lumbar Spinal Cord after 30 Day Space Flight on Biosatellite Bion-M1. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2014, vol. 458, pp. 177-178. DOI: 10.1134/S1607672914050068.
16. Islamov R.R., Gusev O.A., Tanabe A., Terada M., Tyapkina O.V., Petrov K.A., Rizvanov A.A., Kozlovskaya I.B., Nikolskiy E.E., Grigorjev A.I. Full-genome study of gene expression in lumbar spinal cord of mice after 30-day space flight on Bion-M1 biosatellite. *Acta Astronautica*, 2016, vol. 122, pp. 231-236. DOI: 10.1016/j.actastro.2016.01.026.
17. Кузнецов М.С., Резвяков П.Н., Лисюков А.Н., Волков К.Д., Исламов Р.Р., Никольский Е.Е. Транскриптомный профиль спинного мозга мыши после 30-суточного космического полета на биоспутнике «Бιον-М1» и последующей 7-суточной реадaptации на Земле. *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 2017, т. 51, № 7. DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-85-87. [Kuznecov M.S., Rezvyakov P.N., Lisyukov A.N., Volkov K.D., Islamov R.R., Nikol'skiy E.E. Transkriptomnyj profil' spinnogo mozga myshi posle 30-sutochnogo kosmicheskogo poleta na biosputnike «Bion-M1» i posleduyushchej 7-sutochnoj readaptacii na Zemle. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya medicina*, 2017, vol. 51, no. 7. (In Russ.)]

THE DYNAMICS OF GENE EXPRESSION IN THE LUMBAR SPINAL CORD AND SCIATIC NERVE OF MICE IN MODELING HYPOGRAVITY

Shaymardanova G.F.,^{1,2} Gaysin I.A.,² Vasilyeva A. R.,² Krasnova L.A.²

¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS
Lobachevsky st. 2/31, Kazan, 420111, Russia; e-mail: gulnara-fkzn@mail.ru

² Kazan State Medical University
Butlerov st. 49, Kazan, 420012, Russia

Abstract. The work gives a characteristic of the transcriptional activity of the *dlg4*, *mpz*, *anxa5*, *agrn*, *chat* genes in the motor neurons of the lumbar spinal cord and in the sciatic nerve of mice under long-term (30 days) hind limb unloading in comparison with the control group under normal vivarium conditions. Corresponding proteins play an important role in maintaining the structure and conductivity of the peripheral nerve. Selected genes, according to the results of previous studies, increased the level of activity after a 30-day spaceflight. The organization of a model experiment on Earth allowed to trace the dynamics of changes depending on the duration of hanging, and also to compare their manifestations in neurons of the lumbar spinal cord and in the sciatic nerve. According to our data, there is an approximately two-week period during which the system tries to function without radical changes in its metabolism. After this period, adaptation mechanisms results in the sharp activation of these genes (except of *mpz*).

Key words: hind limb unloading, gene expression, sciatic nerve.