

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ АКСОННОГО ТРАНСПОРТА В МОТОНЕЙРОНАХ СПИННОГО МОЗГА МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ ГИПОГРАВИТАЦИИ

М.С.Кузнецов¹, В.В.Валиуллин¹, А.Н.Лисюков¹,
Е.С.Кошпаева¹, В.Р.Саитов^{2,3}, О.С.Развина^{4,5},
М. Hayatsu⁴, T. Ushiki⁴, P.P.Исламов¹

¹ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, Казань, Республика Татарстан, РФ; ²ФГБНУ ФЦТРБ-ВНИВИ, Казань, Республика Татарстан, РФ; ³ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Республика Татарстан, РФ; ⁴Niigata University School of medicine, Japan, Niigata; ⁵G-MedEx Control Center, Japan, Niigata

На основании данных, полученных при изучении транскриптомов поясничного отдела спинного мозга, седалищного нерва и диафрагмальной мышцы мышей после полёта на биоспутнике "Бион-М1", проведён биоинформатический анализ, направленный на установление закономерностей изменений транскриптомов в различных компартментах двигательного нейрона. Полученные результаты позволили выявить нарушения аксонного транспорта в мотонейронах спинного мозга, развивающиеся в условиях невесомости. Эти данные хорошо согласуются с электронно-микроскопическим исследованием спинного мозга экспериментальных животных. Обнаружено, что количество рибосом в перинуклеарной зоне мотонейронов поясничного отдела у мышей после пребывания в невесомости превышало таковое у мышей контрольной группы и группы восстановления (через 1 нед после космического полёта). Полученные результаты являются аргументами в пользу предложенной нами гипотезы о вкладе нарушения аксонного транспорта в патогенезе гипогравитационного двигательного синдрома и могут служить основой для дальнейшего изучения механизмов двигательных нарушений, возникающих в условиях невесомости, а также использоваться в разработке профилактических мер развития гипогравитационного двигательного синдрома у космонавтов.

Ключевые слова: биоспутник "Бион-М1"; поясничный отдел спинного мозга; седалищный нерв; гипогравитационный двигательный синдром; транскриптом

Одним из негативных последствий длительного воздействия гипогравитации на организм в космосе является нарушение функции опорно-двигательного аппарата — гипогравитационный двигательный синдром (ГДС) [7]. Ранее

Адрес для корреспонденции: qmaxksmu@yandex.ru. Кузнецов М.С.

в целях изучения патогенеза ГДС нами уже был проведён транскриптомный анализ поясничного отдела спинного мозга и седалищного нерва мышей после 30-суточного орбитального полёта на биоспутнике «Бион-М1» и последующего 7-суточного периода реадaptации. Были выявлены гены, работа которых потенциально связана с развитием ГДС, в том числе гены, контро-

лирующие аксонный транспорт [1,6]. В ранее проведённом исследовании транскриптомов диафрагмы мышей мы также выявили метаболические и сигнальные пути, принимающие участие в патогенезе ГДС и имеющие отношение не только к мышечной, но и к нервной (терминальные разветвления аксонов) ткани [4].

В терминальных разветвлениях аксонов мотонейронов мыши нами обнаружен белок L26, являющийся компонентом 60S субъединицы рибосомы [2], и установлено, что в двигательной нервной терминали присутствуют все необходимые компоненты для синтеза белка SNAP25, участвующего в слиянии синаптической везикулы с пресинаптической мембраной нейрона [5].

Уровень внутриаксонного синтеза белка напрямую зависит от эффективности аксонного транспорта, обеспечивающего доставку всех компонентов белок-синтезирующего аппарата, включая мРНК, поэтому мы полагаем, что нарушения аксонного транспорта могут способствовать развитию двигательных расстройств в условиях невесомости. В данном исследовании для проверки этой гипотезы был проведён сравнительный анализ транскриптомов спинного мозга и седалищного нерва мышей после полета на биоспутнике «Бион-М1». Дополнительно методом электронной микроскопии было изучено распределение рибосом в перинуклеарной области двигательных нейронов поясничного отдела спинного мозга мышей после космического полёта.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на половозрелых мышах-самцах линии C57BL/6J в возрасте 4-5 мес, массой тела 25.1 ± 3.2 г. Для проведения транскриптомного исследования животные были разделены на три группы: 1-я — «полётная» ($n=2$): мыши, находившиеся в 30-суточном космическом полёте; 2-я — «восстановление» ($n=2$): мыши с 7-суточной реадaptацией после 30-суточного космического полёта; 3-я — контрольная ($n=2$): мыши-дублёры, содержащиеся в условиях биоспутника при естественной гравитации на Земле [3]. Для электронно-микроскопического исследования мотонейронов поясничного отдела спинного мозга животные были также разделены на три группы (по 3 мыши в каждой). Из эксперимента животных выводили методом цервикальной дислокации. Протокол экспериментов одобрен комиссией по биоэтике НИИ митонженерии МГУ им. М.В.Ломоносова (протокол № 35 от 01.11.2012 г.) и комиссией по

биомедицинской этике ИМБП (протокол № 319 от 04.04.2013 г.).

Все этапы предобработки и анализа данных проводили в среде для статистических вычислений R 3.4.4 (R Foundation for Statistical Computing) с использованием дополнительных пакетов сторонних разработчиков из репозитория CRAN (<https://cran.r-project.org>) и Bioconductor (<https://www.bioconductor.org>). После фоновой поправки и квантильной нормализации для анализа были отобраны гены, относящиеся к следующим терминам Gene Ontology: GO:0033750 (локализация рибосом), GO:0042256 (сборка субъединицы рибосом), GO:0019843 (связывание рРНК), GO:0010970 (транспорт с участием микротрубочек). Для анализа дифференциальной экспрессии генов применялись линейные модели, реализованные в пакет *limma*, глобальная поправка Бенджамини—Хохберга использовалась для контроля FDR [8], всего в анализ было включено 245 генов.

Для проведения электронно-микроскопического исследования образцы поясничного утолщения спинного мозга фиксировали в глutarовом альдегиде, постфиксировали в OsO_4 и заливали в эпон-812. Ультратонкие срезы готовили на ультратомографе Ultracut E Reichert и исследовали на электронном микроскопе Hitachi H-7650. Для морфометрического анализа изображения ядер мотонейронов и околоядерных областей подвергали квантильной нормализации с помощью программы Fiji ImageJ [9]. Подсчёт рибосом проводили в автоматическом режиме в 3 квадратах площадью 0.5 мкм^2 в околоядерной области мотонейрона. У каждого животного анализировали не менее 5 клеток. Для сравнения плотности рибосом в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга у животных разных экспериментальных групп использовали тест Крускала—Уоллиса, в качестве *post hoc* критерия применяли тест Данна с поправкой Холма для множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электронно-микроскопическое исследование мотонейронов спинного мозга у мышей после 30-суточного полёта показало, что количество рибосом в перинуклеарной зоне мотонейронов у них было больше, чем у животных контрольной группы и группы восстановления (рис. 1). Различия в количестве рибосом между полётной и контрольной группами были статистически

значимы ($p=0.019$), в контрольной группе и группе восстановления — нет ($p=0.647$). Таким образом, морфометрические данные свидетельствуют о накоплении рибосом в перинуклеарной зоне мотонейронов спинного мозга мышей после 30-суточного космического полёта.

Поскольку большее количество генов с установленной дифференциальной экспрессией в клеточных структурах поясничного отдела спинного мозга и седалищного нерва было ассоциировано с функциями внутриклеточного транспорта и продукции рибосом [2,6], для установления закономерностей изменения уровня мРНК в отдельных компартаментах мотонейрона спинного мозга были отобраны группы генов, принадлежащие к следующим терминам Gene Ontology: GO:0033750 (локализация рибосом), GO:0042256 (сборка субъединиц рибосом), GO:0019843 (связывание рРНК), GO:0010970 (транспорт с участием микротрубочек). Всего исследовали 245 генов. В результате анализа дифференциальной экспрессии генов в седалищном нерве мышей полётной группы было обнаружено 100 генов со статистически значимым по сравнению с контролем повышением уровня экспрессии (83 гена ассоциированы с GO:0010970 — транспорт с участием микротрубочек, 15 генов относятся к GO:0019843 — связывание рРНК). При сравнении транскриптомов седалищного нерва мышей из полётной и контрольной групп выявлено 26 генов со статисти-

чески значимым снижением уровня экспрессии (11 генов ассоциированы с GO:0010970, 13 генов относятся к GO:0019843).

Сравнительный анализ транскриптомов спинного мозга в группе восстановления и в полётной группе выявил 129 дифференциально экспрессирующихся генов: 28 генов с повышением уровня экспрессии (12 генов ассоциированы с GO:0010970, 14 генов — с GO:0019843), 101 ген со снижением уровня экспрессии (82 гена ассоциированы с GO:0010970, 17 генов — с GO:0019843). Таким образом, изменения транскриптомов поясничного отдела спинного мозга после 30-суточного космического полёта и седалищного нерва после 7-суточного периода восстановления у мышей имеют разнонаправленный характер. При этом дифференциально экспрессирующиеся гены в седалищном нерве (при сравнении группы восстановления и полётной группы) и в спинном мозге (при сравнении полётной группы и контрольной) не обнаружены, за исключением гена *Kif23*, кодирующего синтез кинезинподобного протейна (рис. 2).

Результаты анализа изменений транскриптомов спинного мозга и седалищного нерва и распределения рибосом в мотонейронах мышей после космического полёта не должны рассматриваться как сильное доказательство в пользу гипотезы о роли аксонного транспорта в патогенезе двигательных нарушений в условиях

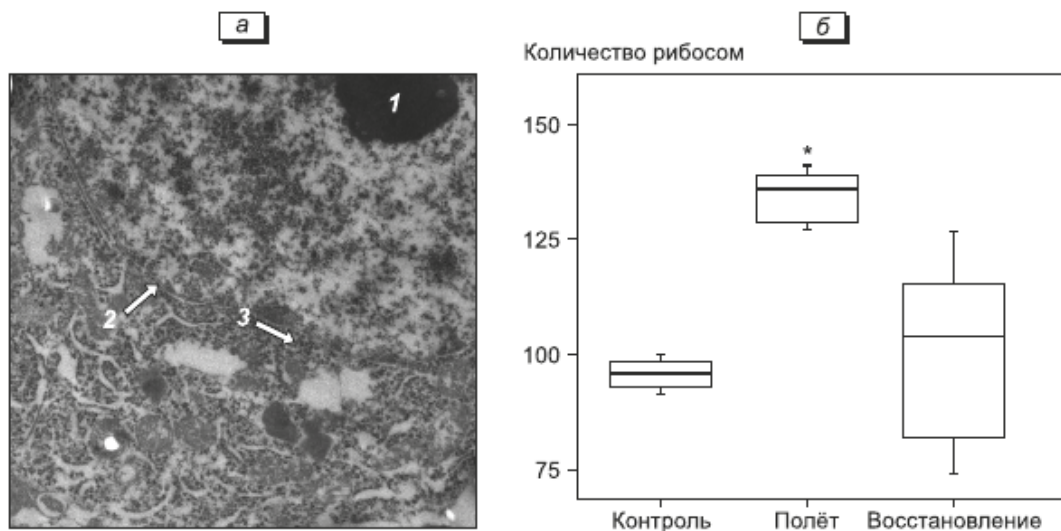


Рис. 1. Анализ распределения рибосом в мотонейронах спинного мозга мыши. а — электронограмма перинуклеарной области мотонейрона мыши полётной группы: 1 — ядрышко, 2 — ядерная оболочка, 3 — рибосомы. б — распределение плотности перинуклеарных рибосом в экспериментальных группах. * $p<0.05$ по сравнению с контролем.

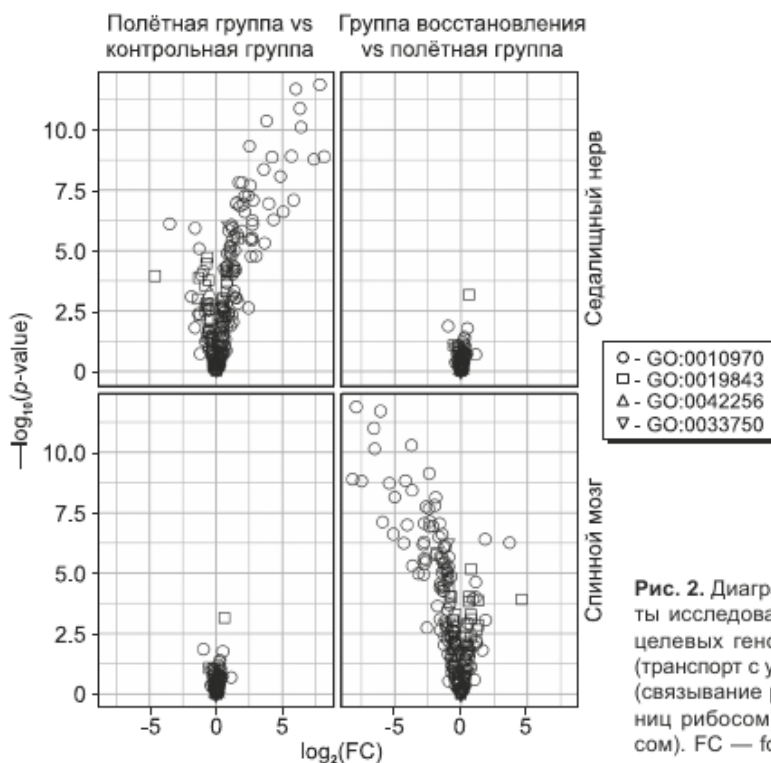


Рис. 2. Диаграмма volcano, отражающая результаты исследования дифференциальной экспрессии целевых генов, ассоциированных с GO:0010970 (транспорт с участием микротрубочек), GO:0019843 (связывание рНК), GO:0042256 (сборка субъединиц рибосом) и GO:0033750 (локализация рибосом). FC — fold change.

длительной гипогравитации. Для верификации связи распределения рибосом и транскриптомных изменений необходимо проведение корреляционного анализа. Однако в силу специфики исследования на животных после космического полёта и ввиду того, что материал для транскриптомного и электронно-микроскопического исследования был взят у малого количества разных животных, не представляется возможным исследовать совместные распределения уровней экспрессии генов и плотность рибосом в перинуклеарной зоне мотонейронов. Вместе с тем мы надеемся, что предстоящие запуски биоспутников позволят получить новый биоматериал, исследования которого смогут подтвердить полученные данные в пользу рассматриваемой гипотезы.

Таким образом, полученные нами данные о сочетанном изменении транскриптомов в спинном мозге и седалищном нерве и содержания рибосом в перинуклеарной области мотонейронов спинного мозга могут свидетельствовать о специфических изменениях в нервных структурах в условиях космического полёта, приводящих к нарушению аксонного транспорта в мотонейронах спинного мозга, и расцениваться как потенциальный механизм развития ГДС.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 17-04-00385).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецов М.С., Резвяков П.Н., Лисюков А.Н., Гусев О.А., Никольский Е.Е., Исламов Р.Р. Биоинформатический анализ транскриптомов седалищного нерва мышей после 30-суточного орбитального полета на биоспутнике «Бион-М1» // Генетика. 2019. Т. 55, № 3. С. 359-364.
2. Сальников В.В., Мишагина Е.А., Козловская И.Б., Никольский Е.Е., Григорьев А.И., Исламов Р.Р. Иммуногистохимическое подтверждение локализации рибосомного белка L26 в терминальных разветвлениях моторного аксона крысы // ДАН. 2009. Т. 427, № 2. С. 270-272.
3. Andreev-Andrievskiy A., Popova A., Boyle R., Alberts J., Shenkman B., Vinogradova O., Dolgov O., Anokhin K., Tsvirkun D., Soldatov P., Nemirovskaya T., Ilyin E., Sychev V. Mice in Bion-M 1 space mission: training and selection // PLoS One. 2014. Vol. 9, N 8. ID e104830. doi: 10.1371/journal.pone.0104830
4. Garanina E., Kuznetsov M., Lisukov A., Rezvyakov P., Tyapkina O., Bikmullina I., Munasipov I., Khamitov A., Kim E., Islamov R. Resemblance of transcriptome changes in mice diaphragm to the terrestrial neuromus-

- cular disorders after 30-day space flight on Bion-M1 biosatellite // *Eur. J. Clin. Invest.* 2019. Vol. 49, N 2. P. 114. doi: 10.1111/eci.13071
5. *Islamov R.R., Samigullin D.V., Rizvanov A.A., Bondarenko N.I., Nikolskiy E.E.* Synaptosome-associated protein 25 (SNAP25) synthesis in terminal buttons of mouse motor neuron // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2015. Vol. 464. P. 272-274.
 6. *Kuznetsov M.S., Lisukov A.N., Rizvanov A.A., Tyapkina O.V., Gusev O.A., Rezvyakov P.N., Kozlovskaya I.B., Tomilovskaya E.S., Nikolskiy E.E., Islamov R.R.* Bioinformatic study of transcriptome changes in the mice lumbar spinal cord after the 30-day spaceflight and subsequent 7-day readaptation on Earth: new insights into molecular mechanisms of the hypogravity motor syndrome // *Front. Pharmacol.* 2019. Vol. 10. ID 747. doi: 10.3389/fphar.2019.00747
 7. *Popov D.V., Khusnutdinova D.R., Shenkman B.S., Vinogradova O.L., Kozlovskaya I.B.* Dynamics of physical performance during long-duration space flight (first results of "Countermeasure" experiment) // *J. Gravit. Physiol.* 2004. Vol. 11, N 2. P. 231-232.
 8. *Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K.* Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43, N 7. ID e47. Doi: 10.1093/nar/gkv007
 9. *Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // *Nat. Methods.* 2012. Vol. 9, N 7. P. 676-682.

Получено 29.04.20