ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ МОТОНЕЙРОНОВ ПОЯСНИЧНОГО ОТДЕЛА СПИННОГО МОЗГА МЫШЕЙ, НАХОДИВШИХСЯ В 30-СУТОЧНОМ ПОЛЕТЕ НА БИОСПУТНИКЕ БИОН-М1, НА НЕДЕЛЬНУЮ РЕАДАПТАЦИЮ К УСЛОВИЯМ ЗЕМНОЙ ГРАВИТАЦИИ

О.В. Тяпкина [1,2,3], П.Н. Резвяков [1], Л.Ф. Нуруллин [1,2,3], К.А. Петров [2,3], Е.Е. Никольский [1,2,3], Р.Р. Исламов [1]

[1] Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия
[2] Казанский институт биохимии и биофизики РАН, Казань, Россия
[3] Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Immunohistochemical research of reaction of motoneurons of lumbar spinal cord of the mice that were in 30-day flight on the BION-M1 biosatellite on a week readaptation to conditions of Earth gravitation

O.V. Tyapkina [1,2,3], P.N. Rezvyakov [1], L.F. Nurullin [1,2,3], K.A. Petrov [2,3], E.E. Nikolskiy [1,2,3], R.R. Islamov [1]
[1] Kazan State Medical University, Kazan, Russia
[2] Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of the RAS, Kazan, Russia
[3] Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

Ранее иммуногистохимическим методом мы установили, что после 30-суточного космического полёта в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга мышей происходит снижение экспрессии белков, ответственных за синаптическую передачу нервного импульса, и белков теплового шока. В данной работе для оценки динамики процесса восстановления животных после космического полёта мы оценивали экспрессию белков, участвующих в синаптической передаче нервного импульса (синаптофизин и PSD95), нейротрофических факторов (сосудистый эндотелиальный фактор роста – VEGF и его рецептор – Flt-1) и белков теплового шока (Hsp25 и Hsp70) в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга мышей после 30-суточного космического полёта на биоспутнике БИОН-М1 и последующей недельной реадаптации к условиям земной гравитации.

В настоящем исследовании установлено, что через неделю пребывания животных в условиях земной гравитации экспрессия синаптофизина продолжала снижаться, в то время как продукция PSD95, Hsp25, Hsp70 и VEGF возрастала по сравнению с животными, выведенными из эксперимента сразу после 30-суточного полёта. Полученные данные свидетельствуют о функциональной пластичности мотонейронов спинного мозга в условиях изменения силы гравитации. Особый интерес представляет тот факт, что «включение» защитных механизмов нейронов (усиление экспрессии белков теплового шока и нейротрофического фактора) происходит не в ответ на воздействие гипогравитации, а через неделю после возвращения животных в условия земного тяготения.

Ключевые слова: космический полёт, гипогравитационный двигательный синдром, мотонейроны, спинной мозг, белки теплового шока, белки синаптической передачи.

Earlier, by an immunohistochemical method we define that after 30-day space flight in motoneurons of mice lumbar spinal cord immunoexpression of the proteins responsible for synaptic transfer of a nervous impulse and proteins of heat shock proteins decrease. In this research for an assessment of animals recovery process dynamics after space flight we studied an immunoexpression of the proteins participating in synaptic transfer of a nervous impulse (synaptophisyne, and PSD95), neurotrophic factors (a vascular endothelial factor of growth – VEGF and its receptor – Flt-1) and heat shock proteins (Hsp25 and Hsp70) in motoneurons of lumbar spinal cord of a mice after 30-day space flight on the BION-M1 biosatellite and the subsequent week readaptation to conditions of Earth gravitation.

In this research by immunohistochemical method determine that after a week of animals staying in the Earth gravitation conditions the immunoexpression of synaptophisyne continued to decrease while the expression of PSD95, Hsp25, Hsp70 and VEGF increased in relation to the animals removed from experiment right after 30-day flight. The obtained data confirm functional plasticity of spinal cord motoneurons in the conditions of gravitation force changing. The fact, which is especially interesting, that «switches on» of neurons protective mechanisms (strengthening of heat shock proteins and neurotrophic factor expression) happens not in response to hypogravitation influence, but only a week after return of animals to conditions of Earth gravitation.

Keywords: space flight, hypogravitational motor syndrome, motoneurons, spinal cord, heat shock proteins, synaptic transfer proteins.

Введение

Одной из главных задач космической медицины является обеспечение безопасности жизни и сохранение здоровья космонавтов. К факторам, оказывающим выраженное воздействие на организм человека в космосе относятся невесомость, радиация, перегрузки, связанные со взлётом и посадкой, стресс. Влияние невесомости на организм человека интенсивно изучается со времен первых пилотируемых полетов в космос. Известно, что невесомость приводит к морфологическим и функциональным сдвигам во многих системах организма, в том числе и в мышечной [1, 2]. Комплекс изменений, развивающихся в мышечной системе человека, находившегося в условиях как реальной, так и моделируемой на Земле невесомости, называют гипогравитационным двигательным синдромом (ГДС) [3]. Для этого синдрома характерны специфические биохимические, морфологические и физиологические изменения, возникающие, в первую очередь, в постуральных мышцах, обеспечивающих приспособление человека к жизни в условиях земной гравитации [3, 4]. Есть основание полагать, что триггер, запускающий развитие ГДС, связан

e-mail: rezvyakovp@gmail.com

с мотонейронами, иннервирующими скелетные мышцы, вовлеченные в патогенез ГДС [3,5].

Для космической медицины актуальным является исследование не только патогенеза ГДС, но и механизмов реадаптации нервно-мышечной системы человека после космического полета. Поскольку по возвращении на Землю космонавты вынуждены проходить продолжительный курс реабилитации, то очевидно, что понимание процессов, происходящих в этот период в организме, будет способствовать разработке более эффективных способов восстановления их работоспособности. Важным этапом исследований, направленных на выяснение механизмов адаптации к невесомости и реадаптации к условиям земной гравитации млекопитающих, явился проект «Бион-М1», представляющий собой логическое продолжение программы биомедицинских исследований на животных в космосе с использованием современных экспериментальных технологий [6].

Ранее нами было показано, что у мышей после 30-суточного космического полета в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга снижается уровень иммунноэкспрессии белков, участвующих в обеспечении синаптической передачи (синаптофизин и PSD95) и белков теплового шока (Hsp25 и Hsp70) [7]. Эксперименты с моделированием гипогравитации на Земле, выполненные в нашей лаборатории с использованием методики антиортостатического вывешивания задних конечностей мышей [8], также продемонстрировали снижение экспрессии синаптофизина и PSD95. Кроме того, в этих же экспериментах было обнаружено уменьшение экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и увеличение экспрессии его рецептора (Flt-1). Таким образом, выявленная реакция этих белков на гипогравитацию, позволяет использовать синаптофизин, PSD95, Hsp25, Hsp70 VEGF и Flt-1 в качестве молекулярных маркеров ГДС.

Цель работы — изучение экспрессии синаптофизина, PSD95, Hsp25, Hsp70 VEGF и Flt-1 для оценки динамики процесса восстановления животных через 7 сут. их реадаптации к условиям земной гравитации после 30-сут. космического полета.

Материал и методы

Исследование выполнено на мышах-самцах линии c57black/6 (масса 27,1±0,3 г), находившихся в 30-сут. космическом полёте на биоспутнике БИОН-М1. Все процедуры с животными проводили в соответствии с международными биоэтическими нормами, утвержденными решением Комиссии по биомедицинской этике ГНЦ РФ ИМБП РАН (протокол № 319 от 04.04.2013 г.) [7]. В настоящее исследование были включены животные из контрольной группы, содержавшиеся в условиях вивария (n = 2), и мыши из экспериментальной группы — реадаптация к условиям земного притяжения в течение 7 сут. (n = 2) после 30 сут. космического полёта. Количество животных в данном исследовании было строго регламентировано организаторами программы БИОН-М1. Эвтаназию животных проводили методом цервикальной дислокации, рекомендованной организаторами программы БИОН-М1 [7]. У мышей обеих групп из позвоночного канала выделяли поясничный отдел спинного мозга и фиксировали его в растворе забуференного 4% параформальдегида (pH = 7,2).

Для криопротекции фиксированный материал помещали в 30% раствор сахарозы (Хеликон, Россия), приготовленный на фосфатно-солевом буфере (Биолот, Россия) с добавлением азида натрия (Sigma, США). На криостате HM 560 Cryo-Star (Carl Zeiss, Германия) готовили свободно плавающие поперечные срезы толщиной 20 мкм. Срезы окрашивали непрямым иммунопероксидазным методом по общепринятому протоколу с использованием первичных антител к маркеру синаптической области синаптофизину (1:300; ab23754, Abcam Plc, Великобритания), к маркеру постсинаптической области PSD95 (1:800; ab18258, Abcam Plc, Великобритания), к белкам теплового шока (Hsp) Hsp 25 (1:200; sc-51956, Santa Cruz Biotechnology Inc, США) и Hsp70 (1:200; sc-66048, Santa Cruz Biotechnology Inc, США), к сосудистому эндотелиальному фактору роста (VEGF) (1:200; sc-152, Santa Cruz Biotechnology Inc, США) и к его рецептору Flt-1 (1:300; sc-316, Santa Cruz Biotechnology Inc, США). Инкубацию ткани с поликлональными первичными антителами проводили в течение 12 ч. при температуре +4°C. Для иммунной реакции с первичными антителами был применён стрептавидин-биотиновый комплекс (Elite ABC Kit, PK-6200, Invitrogen, США). Иммунопреципитат визуализировали при помощи диаминбензидина (DAB Substrate Kit for Peroxidase; SK-4100, Vector Laboratories, США). После окрашивания срезы монтировали на предметных стёклах, высушивали и заключали в среду ImmuMount (Thermo Scientific, США). Изображения микропрепаратов получали на микроскопе Olympus BX51WI (Olympus, Япония) с помощью камеры AxioCam MRm (Carl Zeiss, Германия) и программы AxioVision Rel. 4.6.3. (Carl Zeiss, Германия). Оцифрованные изображения анализировали в программе ImageJ 1.5 (NIH, США). Экспрессию синаптофизина, PSD95, Hsp25, Hsp70, VEGF оценивали в перикарионах, а Flt-1 в ядрах, принадлежащих мотонейронам поясничного утолщения спинного мозга. Мотонейроны идентифицировали на основании их локализации (передние рога спинного мозга) и морфологических признаков (крупного тела с нейритами и центрально расположенного округлого ядра). Денситометрический анализ проводили в программе ImageJ при помощи инструмента свободного выделения окрашенного перикариона или ядра нервной клетки. При одинаковых условиях приготовления микропрепаратов интенсивность иммуногистохимической реакции в мотонейронах оценивали по оптической плотности иммунопреципитата. Для материала, полученного от животных контрольной и экспериментальной групп, средние значения ± ошибка представляли в относительных единицах (о.е.), n соответствует количеству проанализированных нейронов. Для оценки относительных изменений экспрессии белков у мышей экспериментальной группы за 100% принимали средние значения, полученные на материале животных контрольной группы.

Для статистической обработки результатов использовали параметрический t-критерий Стьюдента. Различие между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Уровень экспрессии PSD95, Hsp25, Hsp70, VEGF и Flt-1 оценивали с помощью оцифрованных изображений поперечных срезов спинного мозга животных

контрольной и экспериментальной групп (рис. 1) Следует отметить, что на срезах толщиной 20 мкм в поле зрения попадает вся толщина тела мотонейрона, при этом происходит эффект наложения картины иммуногистохимической реакции «передней» и «задней» поверхности цитоплазматической мембраны. Это обуславливает высокую интенсивность реакции и видимую цитоплазматическую локализацию мембранных антигенов. Фотографии микропрепаратов спинного мозга животных контрольной группы не представлены, поскольку качественных различий в окрашивании при сравнении с экспериментальной группой мышей не выявлено.

При анализе иммуногистохимической реакции поперечных срезов спинного мозга, обработанных антителами к синаптофизину (маркер пресинаптической области), выявлено снижение средних значений оптической плотности иммуногистохимического осадка в телах мотонейронов передних рогов спинного мозга мышей экспериментальной группы (рис. 1А). Интенсивность реакции у животных контрольной группы составила 1,53±0,02 о.е. (n = 91), а у животных экспериментальной группы (группа реадаптации) – 0,95±0,04 о.е. (n = 80).

Анализ иммуногистохимической реакции срезов, инкубированных с антителами к PSD95 (маркер постсинаптической области), показал уменьшение среднего значения плотности иммунопреципитата в телах мотонейронов мышей экспериментальной группы (рис. 1Б). Так, если в контрольной группе интенсивность реакции составила 1,91±0,02 о.е. (n = 60), то в экспериментальной – 1,15±0,03 о.е. (n = 60).

Оценка уровня экспрессии белка теплового шока Hsp25 в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга выявила следующие значения оптической плотности: в контрольной группе – 1,01±0,01 о.е. (n = 60), а в группе реадаптации – 1,23±0,02 о.е. (n = 70) (рис. 1В). Анализ результатов иммуногистохимической реакции с антителами к белку теплового шока Hsp70 показал, что у мышей контрольной группы оптическая плотность составила 0,90±0,03 о.е. (n = 50), а у экспериментальной – 0,92±0,02 о.е. (n = 50) (рис. 1Г).

Исследование интенсивности осадка иммунногистохимической реакции с антителами к VEGF выявило, что в контрольной группе среднее значение оптической плотности составило 0,96±0,03 о.е. (n = 60), а в группе реадаптации – 1,04±0,03 о.е. (n = 80) (рис. 1Д). При этом исследование иммуногистохимической реакции с антителами к Flt-1 продемонстрировало среднее значение оптической плотности у мышей контрольной группы 0,97±0,02 о.е. (n = 72), а у животных экспериментальной – 0,84±0,02 о.е. (n = 50) (рис. 1Е).

Анализ результатов проведенного иммуногистохимического исследования оптической плотности преципитата образцов после инкубации срезов спинного мозга мышей в среде со специфическими антителами показал, что у животных, проходивших недельную реадаптацию к условиям Земли, имеет место достоверное снижение интенсивности экспрессии таких белков, как синаптофизин (38%), PSD95 (40%), Flt-1 (13,5%) и увеличение интенсивности продукции Hsp25 (22%) и VEGF (8%). Уровень экспрессии белка теплового шока Hsp70 оставался практически неизменным.

Обсуждение

В предыдущем исследовании нами было обнаружено, что пребывание мышей в условиях 30-сут. космического полета приводит к существенному уменьшению экспрессии белков синаптического аппарата: синаптофизина (на 21%) и PSD95 (на 55%,), а также белков теплового шока Hsp25 (на 15%) и Hsp70 (на 10%) [5]. Эти данные дали основание заключить, что в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга мышей, находившихся в условиях орбитального

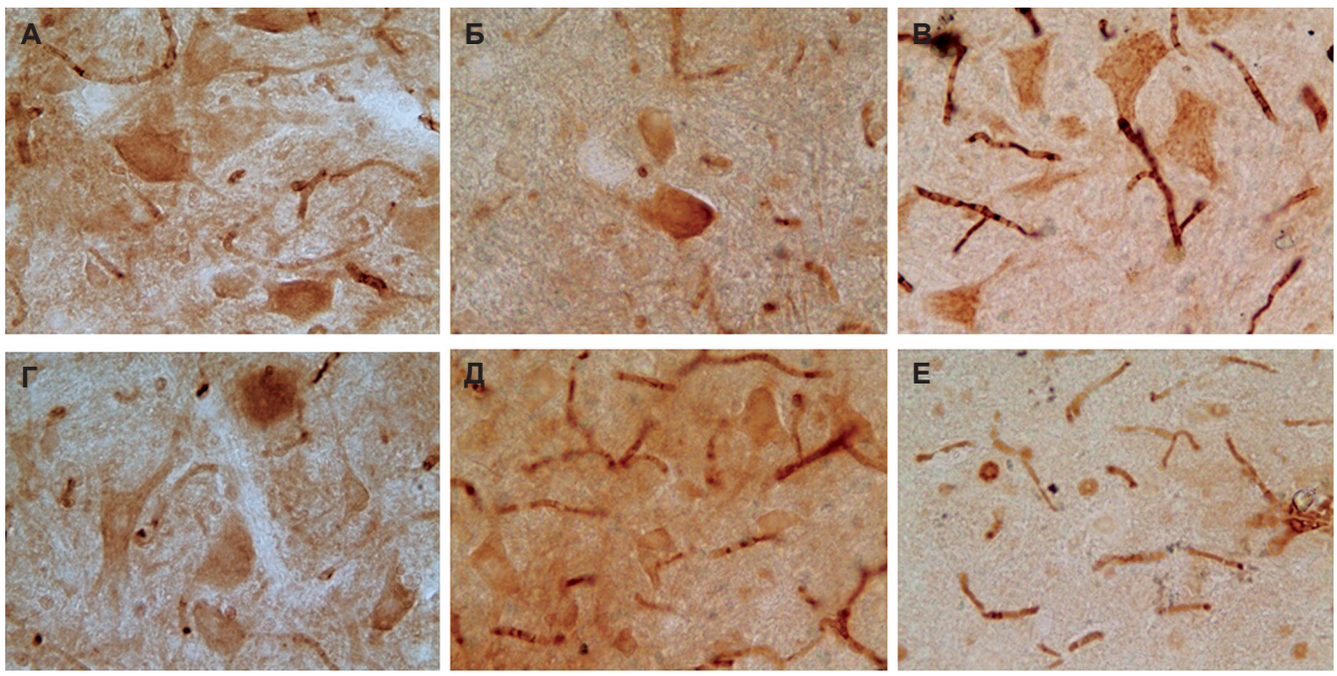

Рис. 1. Мотонейроны поясничного отдела спинного мозга мышей по истечении 7-суточного периода реадаптации после 30-суточного космического полета. Иммуногистохимическая реакция с антителами к:
А – синаптофизину; Б – PSD95; В – Hsp25; Г – Hsp70; Д – VEGF; Е – Flt-1. Ув. ×400

полета, могут развиваться нарушения в работе синаптического аппарата, поскольку синаптофизин является одним из ключевых белков «машины экзоцитоза» медиаторов [9, 10], а белок PSD95 отвечает за функционирование рецепторов и ионных каналов постсинаптической мембраны, и, кроме того, участвует в обеспечении синаптической пластичности ЦНС [11, 12]. Пониженный уровень экспрессии белков теплового шока, выявленный после орбитального полета, можно рассматривать как свидетельство снижения адаптационно-компенсаторных механизмов в нервных клетках, поскольку известно, что одним из универсальных защитных механизмов клетки в ответ на стресс как раз и является усиление экспрессии белков теплового шока. Не случайно понижение уровня экспрессии Hsp25 было обнаружено при развитии дегенерации двигательных нейронов у мышей с моделью бокового амиотрофического склероза [13]. Однако ранее в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга крыс после антиортостатического вывешивания нами было выявлено усиление экспрессии Hsp25 и Hsp70 [5]. В работах других авторов было показано, что атрофические процессы в скелетных мышцах крыс, находящихся в условиях антиортостатического вывешивания или космического полёта, сопровождаются уменьшением как уровня мРНК, кодирующих Hsp25 и Hsp70 [14], так и снижением количества самих белков, а предварительное воздействие теплового стресса ослабляет атрофию в камбаловидной мышце у крыс, находящихся в условиях опорной разгрузки [15].

Кроме того, в нашей предыдущей работе получены данные о подавлении нейротрофических и нейропротекторных механизмов в мотонейронах мышей после космического полета, о чем свидетельствует отсутствие экспрессии нейротрофического фактора VEGF и его рецептора Flt-1 [7]. Также имеются доказательства важной роли VEGF и Flt-1 в обеспечении гомеостаза нервных клеток, а их дефицит отмечается при развитии нейродегенеративных, ишемических и опухолевых заболеваний ЦНС [16–18].

В настоящем исследование установлено, что после 7-сут. периода реадаптации к условиям земной гравитации экспрессия синаптофизина в мотонейронах спинного мозга продолжала снижаться. Для белка PSD95 была выявлена тенденция к восстановлению уровня экспрессии, который, однако, не достигал уровня, присущего мышам контрольной группы. Анализ белков теплового шока продемонстрировал усиление их экспрессии. Так экспрессия Hsp70 восстанавливалась до значений, характерных для животных контрольной группы, а уровень экспрессии Hsp25, даже несколько превышал контрольные значения. На фоне повышенной экспрессии белков теплового шока в мотонейронах животных в период реадаптации было выявлено и усиление экспрессии VEGF.

Полученные данные свидетельствуют о существенной реакции мотонейронов поясничного отдела спинного мозга мышей как на космический полёт, так и на последующее воздействие земной гравитации.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют в пользу справедливости ранее выдвинутой гипотезы о важной роли мотонейронов спинного мозга в патогенезе ГДС и его преодолении в восстановительном периоде на Земле. Несомненно, что выявленное на фоне сниженной экспрессии белков теплового шока уменьшение синтеза белков, обеспечивающих синаптическую передачу возбуждения, может составлять один из компонентов патогенеза ГДС. Важным представляется установление факта, что механизмы защиты нейронов (продукция Hsp и VEGF) включаются не в ответ на воздействие гипогравитации, а после возвращения животных к условиям земного тяготения.

Благодарности

Исследование поддержано грантами: Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий», субсидией, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров, РНФ № 15-15-20036.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kalb R., Solomon D. Space exploration, Mars, and the nervous system. Arch. Neurol. 2007; 64(4): 485-90.
2. Williams D., Kuipers A., Mukai C. et al. Acclimation during space flight: effects on human physiology. CMAJ 2009; 180(13): 1317-23.
3. 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; 5: 508-21.
4. Григорьев А.И., Шенкман Б.С. Скелетная мышца в безопорном мире. Вестник РАН 2008; 78(4): 337-45.
5. Islamov R.R., Tiapkina O.V., Nikol'skiĭ E.E. et al. The role of spinal motoneurons in the mechanisms of hypogravitational motor syndrome development. Ross. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova 2013; 99(3): 281-93.
6. Андреев-Андриевский А.А., Шенкман Б.С., Попова А.С. и др. Экспериментальные исследования на мышах по программе полета биоспутника «БИОН-М1». Авиакосмическая и экологическая медицина 2014; 48(1): 14-27.
7. Тяпкина О.В., Резвяков П.Н., Нуруллин Л.Ф. и др. Иммуногистохимическое исследование мотонейронов поясничного отдела спинного мозга мышей после 30-суточного космического полета на биоспутнике БИОН-М1. Гены и Клетки 2014; IX(3)Б: 263-6.
8. Morey-Holton E.R., Globus R.K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects, J. Appl. Physiol. 2002; 92 (4): 1367-77.
9. Kwon S.E., Chapman E.R. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. Brain Res. Rev. 2009; 60(2): 341-8.
10. Sasaki S., Maruyama S. Decreased synaptophysin immunoreactivity of the anterior horns in motor neuron disease. Acta Neuropathol. 1994; 87(2): 125-8.
11. Wheal H.V., Chen Y., Mitchell J. et al. Molecular mechanisms that underlie structural and functional changes at the postsynaptic membrane during synaptic plasticity. Prog. Neurobiol. 1998; 55(6): 611-40.
12. Béïque J.C., Andrade R. PSD-95 regulates synaptic transmission and plasticity in rat cerebral cortex. J. Physiol. 2003; 546: 859-67.
13. Maatkamp A., Vlug A., Haasdijk E. et al. Decrease of Hsp25 protein expression precedes degeneration of motoneurons in ALS-SOD1 mice. Eur. J. Neurosci. 2004; 20(1): 14-28.
14. Oishi Y., Ishihara A., Talmadge R.J. et al. Expression of heat shock protein 72 in atrophied rat skeletal muscles. Acta Physiol. Scand. 2001; 172: 123-30.
15. Naito H., Powers S.K., Demirel H.A. et al. Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. J. Appl. Physiol. 1985; 88(1): 359-63.
16. Raab S., Plate K.H. Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and the nervous system. Acta Neuropathol. 2007; 113(6): 607-26.
17. Islamov R.R., Chintalgattu V., Pak E.S. et al. Induction of VEGF and its Flt-1 receptor after sciatic nerve crush injury. Neuroreport. 2004; 15(13): 2117-21.
18. Verheyen A., Peeraer E., Lambrechts D. et al. Therapeutic potential of VEGF and VEGF-derived peptide in peripheral neuropathies. Neuroscience 2013; 6(244): 77-89.

Поступила: 22.03.2016