

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень разработанности темы

Гипогравитация нарушает функцию практически всех систем организма, что проявляется на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях (Caiozzo V.J. et al., 1996; Григорьев А.И. и соавт., 2004; Kozlovskaya I.V. et al., 2007). При этом уже в течение первых суток в скелетных мышцах, обеспечивающих поддержание позы, развиваются нарушения, которые составляют основу гипогравитационного двигательного синдрома (Ohira Y. et al., 2002; Kozlovskaya I.V. et al., 2007; Fitts R.H. et al., 2010). Исследования двигательной функции в невесомости и в условиях её моделирования на Земле выявили сдвиги во всех компонентах регуляции двигательной системы (Edgerton V.R., 1996; Reschke M.F. et al., 1998; Nagy E. et al., 2000; Григорьев А.И. и соавт., 2004). Гипогравитационный двигательный синдром характеризуется атрофией мышц, сопровождающейся уменьшением объёма мышечных волокон и деструкцией миофибриллярного аппарата (Шумилина Ю.В. и соавт., 2010). При этом установлена важная роль сенсорного обеспечения двигательных функций (Козловская И.Б. и соавт., 1984; 1988). При гипогравитационном двигательном синдроме также отмечается снижение афферентной стимуляции мотонейронов или их деафферентация, которая приводит к повышенной возбудимости нейронов (Kozlovskaya I.V. et al., 2007). Патогенез гипогравитационного двигательного синдрома может включать не только изменения сократительного аппарата мышцы, но и нарушение механизма экзоцитоза медиатора и структур, контролирующих его регуляцию (Никольский Е.Е. и соавт., 2005). В условиях моделирования гипогравитации на Земле в виде опорной разгрузки задних конечностей (ОРЗК) увеличивается содержание возбуждающих и тормозных нейромедиаторов в спинном мозге (Treffort N. et al., 2006). На модели ОРЗК показано снижение активности холинацетилтрансферазы, которое приводит к развитию характерных для гипогравитационного двигательного синдрома изменений со стороны скелетной мышцы (Исламов Р.Р. и соавт., 2007; 2008). Морфо-функциональные изменения в нейронах в условиях космического полёта могут быть первичными или опосредоваться через влияния со стороны глиальных клеток. При этом роль глиального компонента и информационных межклеточных взаимодействий в системе «нейрон – глия» в развитии гипогравитационного двигательного синдрома остаётся неясной. Есть основание полагать, что изменение характера взаимодействий между нейронами и глией в спинном мозге при гипогравитационном двигательном синдроме может приводить к сдвигам в морфофункциональном состоянии мотонейронов.

Астроцитам принадлежит ведущая роль в регуляции гомеостаза калия, удалении из внеклеточного пространства избыточного глутамата, антиоксидантной защите, метаболическом обеспечении и модуляции возбудимости нейронов (Hulsebosch G.E. et al., 2009; Clarke L.E., Barres B.A., 2013). Активация астроцитов в спинном мозге негативно влияет на соседние нервные клетки (Jing L. et al., 2013), увеличивая экспрессию провоспалительных цитокинов, концентрацию АТФ и оксида азота (Hulsebosch G.E. et al., 2009; Karimi-Abdolrezaee S., Billakanti R., 2012). Изменение характера взаимодействий в системе «нейрон – астроцит» не только влияет на функцию мотонейронов, но может также явиться причиной выраженных нарушений их структурной и цитохимической организации. Представляется весьма вероятным, что эти реакции могут завершиться дегенерацией и гибелью мотонейронов.

При гипогравитационном двигательном синдроме демиелинизация может сопровождать и усиливать двигательные нарушения. На модели ОРЗК молекулярно-генетический анализ выявил снижение в спинном мозге экспрессии генов *mp2* и *mp22*, кодирующих белки миелина, которое приводит к дефектам миелинизации (Тяпкина О.В. и соавт., 2013) и изменению скорости проведения импульсов по аксонам (Исламов Р.Р. и соавт., 2011). Остается открытым вопрос об изменении фенотипа миелинообразующих клеток в патогенезе развития гипогравитационного двигательного синдрома.

Реакция микроглиальных клеток при гипогравитационном двигательном синдроме также практически не изучена. Микроглия, как резидент иммунной системы в ЦНС, является одним из важных компонентов в регуляции гомеостаза в мозге. Активация микроглии усиливает гибель нейронов, что показано при болезни Альцгеймера, боковом амиотрофическом склерозе и травме спинного мозга (Ribes S. et al., 2009).

Для исследования воздействия гипогравитации на организм используют различные экспериментальные модели, такие как «сухая» иммерсионная гипокинезия, иммобилизация и т.п. (Саенко И.В. и соавт., 2000). При этом среди них модель ОРЗК представляется наиболее оптимальной для имитации патологических сдвигов в условиях космического полёта. Эта модель в наибольшей мере способствовала расшифровке известных на сегодняшний день механизмов развития гипогравитационного двигательного синдрома. На модели ОРЗК было показано повышение уровня экспрессии белков HSP25 и HSP70, препятствующих развитию апоптоза в спинном мозге (Islamov R.R. et al., 2007; 2011). При изучении мотонейронов поясничного утолщения спинного мозга мышей после 30-суточного космического полёта выявлено снижение экспрессии белков HSP25, HSP70, PSD95 и синаптофизина, которые играют важную роль в адаптационно-компенсаторных процессах (Тяпкина О.В. и соавт., 2013).

Возможность изменения в условиях космического полёта и ОРЗК фенотипа и поведения глиальных клеток как причины нарушения взаимодействий между нейронами и глией и последующих патологических сдвигов в морфофункциональном состоянии мотонейронов не изучена. Представляется актуальным оценить роль макро- и микроглиальных клеток спинного мозга в патогенезе гипогравитационного двигательного синдрома в условиях ОРЗК и космического полёта.

Цели и задачи исследования

Цель исследования – выявить реакции глии спинного мозга мыши в условиях космического полёта и имитирования гипогравитации на Земле.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**, решаемые в условиях космического полёта по международному проекту БИОН-М1 и на модели ОРЗК:

1. Проанализировать реакцию астроцитов, миелинообразующих и микроглиальных клеток в сером и белом веществе спинного мозга мыши в условиях космического полёта и ОРЗК на Земле.
2. В условиях реадаптации мышей на Земле после космического полёта проанализировать динамику фенотипических изменений макро- и микроглиальных клеток в сером и белом веществе поясничного и шейного отделов спинного мозга.
3. Сопоставить фенотипические характеристики глиальных клеток поясничного и шейного отдела при ОРЗК и космическом полёте по экспрессии маркеров астроцитов, миелинообразующих и микроглиальных клеток в сером и белом веществе спинного мозга мыши.

Научная новизна

Впервые получены новые данные о реакции астроцитов, а также миелинообразующих и микроглиальных клеток в зонах серого и белого вещества в области поясничного утолщения спинного мозга мыши в условиях 30-суточного космического полёта. Впервые установлено, что пребывание мышей в этих условиях и при ОРЗК приводит к фенотипическим сдвигам в популяциях астроцитов в поясничном и шейном утолщениях спинного мозга. Принципиально новыми являются данные о том, что в условиях космического полёта и ОРЗК в поясничном утолщении спинного мозга количество миелинообразующих клеток уменьшается, а микроглиальных клеток в поясничном и шейном утолщениях возрастает. Впервые показано, что увеличение экспрессии маркеров миелинообразующих клеток на 7 сутки реадаптации на Земле после космического полёта свидетельствует о восстановлении отклоняющихся показателей и указывает на потенциальную возможность достаточно быстрого восстановления миелинизированных волокон при гипогравитационном двигательном синдроме. Получены приоритетные данные

об отличительных особенностях фенотипических сдвигов глиальных клеток спинного мозга при космическом полёте и ОРЗК.

Теоретическое и практическое значение работы

Полученные в работе данные о реакции астроцитов, а также миелинообразующих и микроглиальных клеток в сером и белом веществе поясничного и шейного отделов спинного мозга мыши в условиях космического полёта и ОРЗК углубляют представления о механизмах развития гипогравитационного двигательного синдрома. Данные проведённых исследований могут быть использованы при рассмотрении глии в качестве мишени при разработке средств профилактики моторных расстройств при гипогравитационном двигательном синдроме в условиях длительных космических полётов.

Положения, выносимые на защиту

1. В условиях космического полёта и опорной разгрузки задних конечностей при развитии гипогравитационного двигательного синдрома изменяются фенотипы клеток макро- и микроглии в шейном и поясничном отделах спинного мозга.
2. Реадаптация на Земле после космического полёта включает возможность нормализации фенотипических сдвигов глиальных клеток спинного мозга.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа представляет собой иммунофлуоресцентное исследование шейного и поясничного отделов спинного мозга мыши после 30-суточного космического полёта и ОРЗК с целью определения роли глии в патогенезе гипогравитационного двигательного синдрома. Дизайн исследования отражен в протоколе, одобренном локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанского ГМУ Минздрава России. В исследовании использовались иммунофлуоресцентные методы и морфометрия, а также статистические инструменты анализа данных.

Степень достоверности

Достоверность результатов исследования определяется достаточным объемом и корректным формированием изучаемых выборок, высокой информативностью современных методов исследования, адекватностью математических методов обработки данных поставленным задачам. Сформулированные выводы и практические рекомендации аргументированы и логически вытекают из результатов исследования.

Практическое использование результатов исследования

Результаты диссертационного исследования внедрены в раздел «Физиология нервной системы» учебно-методического курса «Нормальной физиологии» на кафедре нормальной физиологии; в курс «Молекулярной неврологии» на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии; в курс «Нейробиологии» на кафедре медицинской биологии и

генетики ФГБОУ ВО Казанского ГМУ Минздрава России для аспирантов и студентов лечебного и педиатрического факультетов.

Апробация материалов диссертации

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК. Основные положения и результаты работы доложены на Международных молодежных научных конференциях «Ломоносов» (Москва, 2013, 2014, 2015), Международной научной конференции «COSPAR» (Москва, 2014), VIII Всероссийском с международным участием конгрессе «Симбиоз-Россия 2015» (Новосибирск, 2015), XI Международной научно-практической конференции «Пилотируемые полёты в космос» (Звёздный городок, 2015), III межвузовской научно-практической конференции «Молодёжь и медицинская наука» (Тверь, 2015), Международной конференции «Пилотируемое освоение космоса» (Москва, 2016), XIII Конгрессе Международной ассоциации морфологов (Петрозаводск, 2016).

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, обсуждения полученных данных, выводов, списков литературы и сокращений. Работа иллюстрирована 2 таблицами и 19 рисунками. Библиографический список содержит 260 источников, в том числе 21 отечественных и 239 работ иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 28 половозрелых мышах инбредной линии C57/bl6, самцах весом 25 ± 3 г, возраст которых к началу исследования составлял 19–20 нед. (таблица 1). Во всех экспериментах мышей содержали группами по 3 особи в клетке.

Таблица 1. Экспериментальные группы животных

Группа	Характер эксперимента	Количество мышей
Интактная	Стандартные условия вивария	8
Опорная разгрузка задних конечностей (ОРЗК)	Круглосуточное антиортостатическое положение животных в течение 30 суток	8
Полётная	30-суточный космический полёт на биоспутнике БИОН-М1	3
Контрольная полётной группы	30 суток содержания на Земле в условиях, максимально моделирующих среду обитания на биоспутнике	3
Восстановленная	30-суточный космический полёт на биоспутнике БИОН-М1 с 7-суточным периодом реадаптации на Земле	3
Контрольная восстановленной группы	30 суток содержания на Земле в условиях, максимально моделирующих среду обитания на биоспутнике +7 суток реадаптации на Земле в стандартных условиях вивария	3

Модель ОРЗК воспроизводили стандартным методом (Morey-Holton E.R., Globus R.K., 2002), при этом животное, максимально вытянувшись, не доставало задними конечностями настил и могло свободно перемещаться по клетке на передних конечностях. Животных интактной группы и ОРЗК содержали со стандартным суточным режимом и свободным доступом к воде и корму. Спинной мозг мышей полётной и восстановленной групп, а также их контроли были предоставлены ГНЦ РФ – ИМБП РАН из полётного эксперимента на борту биоспутника БИОН-М1 (Андреев-Андриевский А.А. и соавт., 2014). Эксперименты на животных проводили на основании решения Комиссии по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 319 от 4.04.2013 г.), одобряющей исследования по проекту БИОН-М1. Все процедуры с животными проводили в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике (Генин А.М. и соавт., 2001).

На 30 сутки эксперимента мышей групп ОРЗК и интактных мышей наркотизировали путём внутрибрюшинной инъекции хлоралгидрата (Sigma) (80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г), после чего их транскардиально перфузировали 4% раствором параформальдегида (4°C). Забор проводили тотчас, не допуская их касания задними конечностями пола клетки или иных поверхностей. Животных полётной, контрольной полётной, восстановленной и контрольной восстановленной групп забивали методом цервикальной дислокации. Выделяли шейный и поясничный отдел спинного мозга, который процессировали для иммунофлуоресцентного исследования. Для гистологического исследования спинной мозг мышей фиксировали в растворе параформальдегида в течение 24-х часов. В целях криопротекции фиксированную ткань насыщали 30% раствором сахарозы и перед замораживанием помещали в заливочную среду TBS (Triangle Biomedical Science, Durham, NC). Поперечные срезы (20µm) были приготовлены на криостате HM 560 (Thermo Scientific) при температуре -25°C с последующим хранением в 30% растворе сахарозы при температуре 4°C.

Иммунофлуоресцентные реакции проводили на поперечных свободно плавающих срезах шейного и поясничного отделов спинного мозга. Срезы промывали в PBS с 1% Triton X-100 в течение 5 минут 3 раза, неспецифические места блокировали связывания в PBS, содержащим 1% Тритон X-100 и 5% сыворотку лошади, в течение 1 часа при комнатной температуре. Астроциты выявляли с помощью иммуногистохимических реакций с антителами против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) (Santa Cruz, 1:250), белка S100B (Santa Cruz; 1:1200), нейроны - бета-тубулина 3 (βTubIII), миелинообразующие клетки - белка миелина олигодендроцитов (OSP) (Santa Cruz, 1:100), транскрипционного фактора олигодендроцитов 2 (Olig2) (Santa Cruz, 1:200), белка миелина P0 (Abcam, 1:100), белка Krox24 (R&D Systems, 1:30), Krox20 (Covance, 1:50) и Cx47 (Santa Cruz, 1:150). Клетки

микроглии выявляли при помощи антител против Iba1 (Biocare, 1:200) и Нохb8 (Abcam, 1:100). Первый этап иммунофлуоресцентной реакции проводили при температуре 4°C в течении 12 ч. После промывки в PBS срезы инкубировали с вторичными антителами, в качестве которых применяли ослиные Ig, конъюгированные с флуорохромом Alexa 488 (Invitrogen, 1:200), Alexa 555 (Invitrogen, 1:200) и Alexa 647 (Invitrogen, 1:200). Для визуализации ядер клеток срезы дополнительно окрашивали в течение 10 минут при комнатной температуре раствором пропидиума йодида (краситель DAPI, 10 мкг/мл в PBS, Sigma). Анализ поперечных срезов шейного и поясничного утолщения спинного мозга проводили с помощью конфокального сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany).

Для иммуногистохимического анализа глии были выбраны следующие зоны (рисунок 1): вентральные рога (ventral horn, VH), кортикоспинальный тракт в дорсальных канатиках (corticospinal tract, CST), вентральные канатики (ventral funiculus, VF), зона центрального канала (central channel, CC), зона вхождения дорсальных корешков (dorsal root entry zone, DREZ). Во всех этих зонах иммунопозитивные клетки подсчитывали в квадрате площадью 0,05 мм² в каждом из 6 срезов с интервалом 0,5 мкм. В симметричных зонах спинного мозга, таких как VH, VF, DREZ, подсчёт клеток производили на обеих сторонах среза спинного мозга.

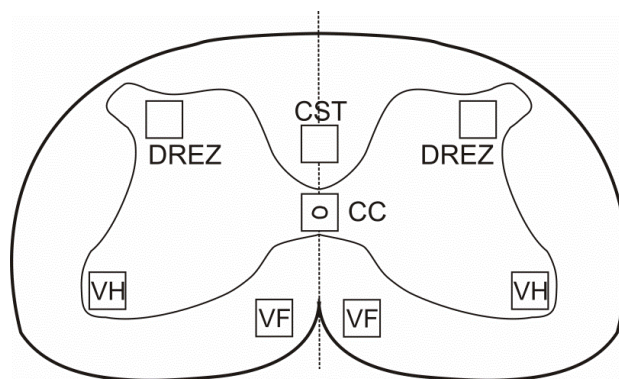


Рис. 1. Зоны подсчёта клеток глии выделены квадратами: VF – вентральный канатик, VH – вентральный рог, CST – кортикоспинальный тракт, DREZ – зона вхождения дорсальных корешков, CC – центральный канал.

Цифровые изображения срезов спинного мозга анализировали с помощью программы ImageJ. При подсчёте количества клеток принадлежность иммунопозитивных структур конкретной клетке определяли по локализации её ядра, выявляемого при помощи DAPI.

В качестве показателя уровня экспрессии белков GFAP, S100B и OSP в клетках использовали величину плотности флуоресценции соответствующих маркеров на цифровом

изображении среза. Плотность флуоресценции в процентах вычисляли как отношение суммы ненулевых пикселей данного канала флуоресценции к площади изображения в пикселях.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Origin8.0 Pro. Достоверность различий определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни-Вилкоксона. Для всех статистических данных уровень достоверности был принят меньше 0,05 ($P \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Поясничный отдел спинного мозга

Астроциты

GFAP-иммунопозитивные клетки. Для анализа астроцитов использовали маркеры GFAP и S100B (рисунок 2). На 30 сутки эксперимента у мышей полётной группы количество GFAP⁺-астроцитов в VH уменьшается (рисунок 3А). В других зонах серого и белого вещества достоверные сдвиги по этому показателю не зарегистрированы. На модели ОРЗК показано, что сдвиги в количестве GFAP⁺-астроцитов разнонаправлены в различных зонах спинного мозга. В сером веществе (VH) экспрессия GFAP достоверно снижается с одинаковой выраженностью как в условиях космического полёта, так и при ОРЗК. Это свидетельствует об однонаправленных сдвигах популяции GFAP⁺-астроцитов, происходящих в спинном мозге мышей при реальной гипогравитации и её симуляции на Земле.

S100B-иммунопозитивные клетки. Количество S100B⁺-клеток в полётной группе устойчиво возрастает как в сером (CC), так и в белом (CST) веществе (рисунок 3Б). В этих зонах различия в количестве S100B⁺-клеток проявляются в большей мере, чем в случае GFAP⁺-клеток. Это может быть связано с тем, что внутриклеточные сигнальные пути с участием белка S100B наиболее чувствительны к действию факторов космического полёта (стресс, перегрузки, невесомость). Можно также предполагать, что более существенные сдвиги в количестве S100B-клеток у мышей из полётной группы связаны с более выраженной гетерогенностью популяции S100B клеток в мозге, которая включает не только астроциты, но также олигодендроциты и NG2 клетки (Treffort N. et al., 2009).

В условиях ОРЗК количество S100B⁺-клеток снижается во всех зонах подсчёта. На 30 сутки космического полёта, наоборот, как уже упоминалось, наблюдается тенденция увеличения количества клеток, экспрессирующих данный белок, в белом и сером веществе поясничного утолщения.

GFAP/S100B-иммунопозитивные клетки. На 30 сутки между полётной группой и её контролем по количеству GFAP⁺/S100B⁺-клеток достоверное различие обнаружено только в

DREZ (рисунок 3B). В этой зоне количество GFAP⁺/S100B⁺-клеток увеличивается у животных полётной группы. Сдвиги в количестве GFAP/S100B-иммунопозитивных клеток при ОРЗК и в полётной группе разнонаправлены и наиболее выражены в группе ОРЗК. У мышей группы ОРЗК количество GFAP⁺/S100B⁺-клеток достоверно меньше, чем у интактных животных, но больше, чем у мышей полётной группы, в каждой из исследуемых зон.

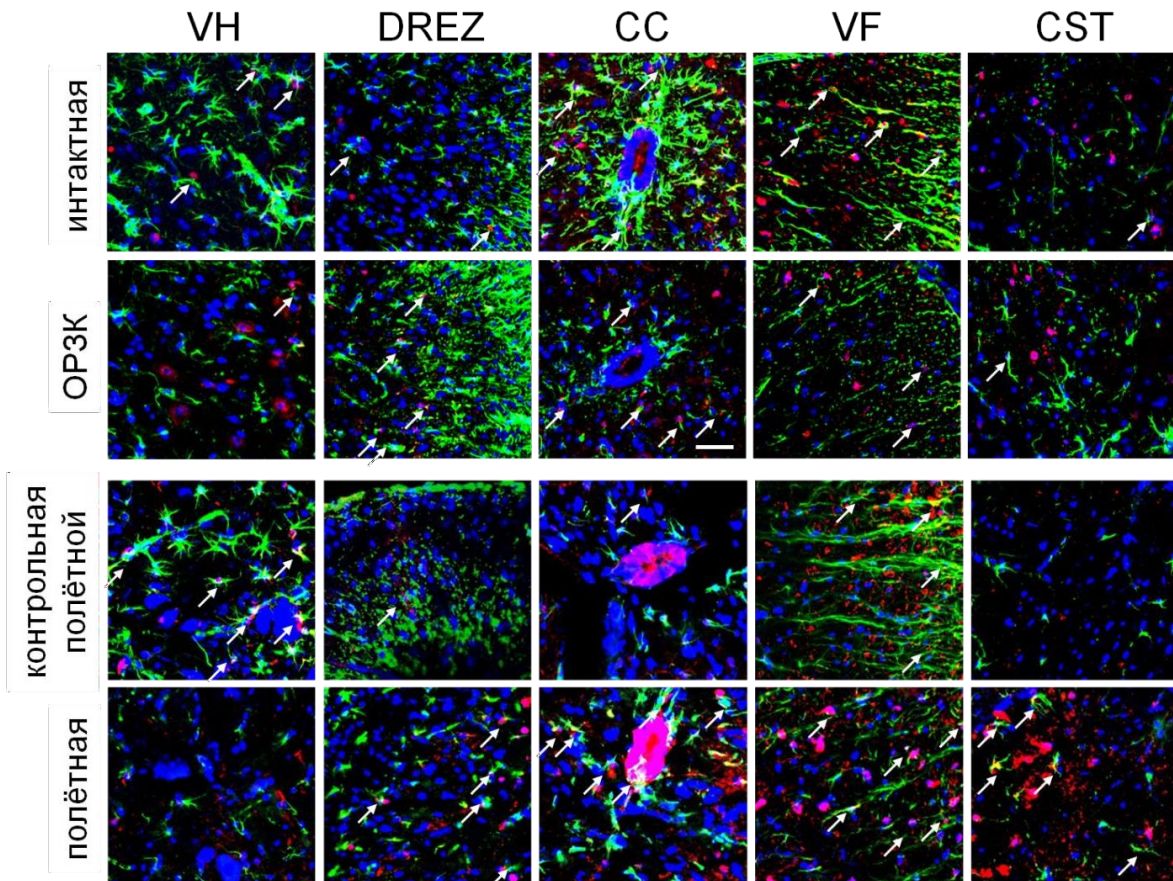
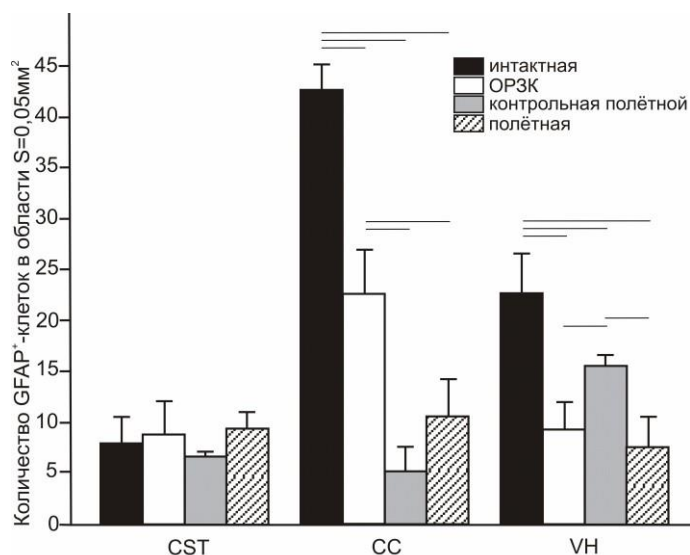


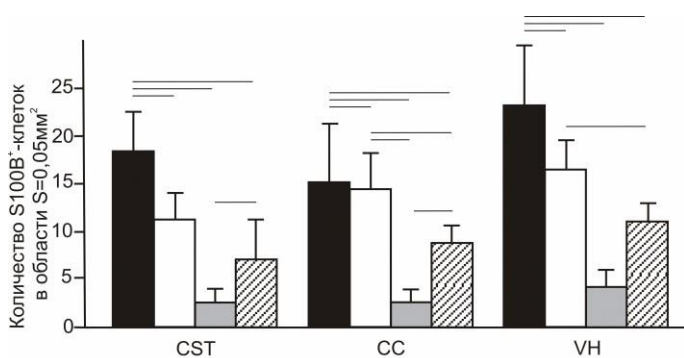
Рис. 2. Экспрессия GFAP (зелёный) и S100B (красный) в поясничном отделе спинного мозга на 30 сутки у мышей при ОРЗК и в условиях космического полёта. При ОРЗК снижается экспрессия белка GFAP, что прослеживается и в полётной группе; экспрессия белка S100B увеличивается в полётной группе, при ОРЗК данный показатель уменьшается. Выявлена колокализация белков GFAP и S100B; GFAP⁺/S100B⁺-клетки отмечены стрелкой. Ядра визуализированы с DAPI (синий). Масштаб 100 мкм.

Причины уменьшения численности астроцитов, экспрессирующих GFAP, остаются неясными. Оно может быть результатом кумулятивного эффекта многих негативных факторов и осуществляться как в результате прямого их воздействия на астроциты, так и опосредованно через нейроны и глиальные клетки других типов. Негативное воздействие гипогравитации на цитоскелет астроцитов, в том числе на промежуточные филаменты, было показано ранее в опытах *in vitro* и *in vivo* (Uva B.M. et al., 2002; Nguon K. et al., 2004).

А)



Б)



В)

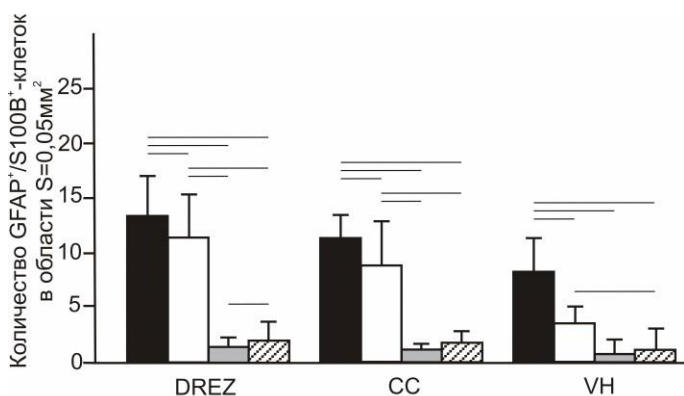


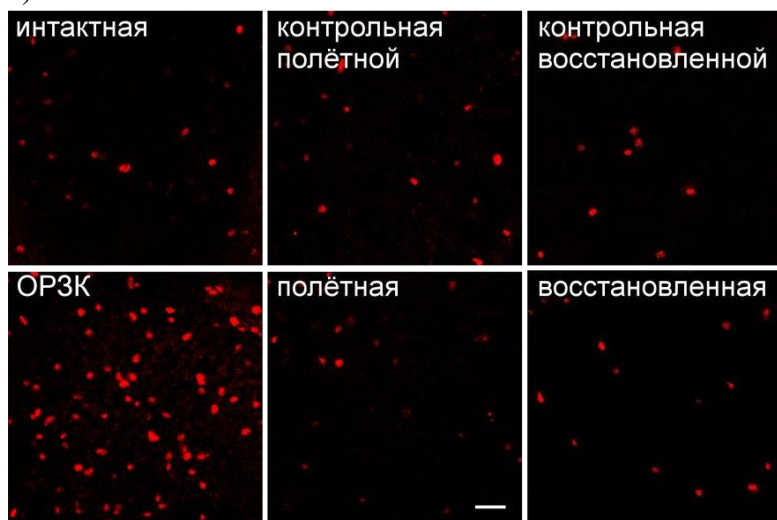
Рис. 3. Изменения количества GFAP⁺- (А), S100B⁺- (Б) и GFAP⁺/S100B⁺- (В) астроцитов в поясничном отделе спинного мозга на 30 сутки у мышей при ОРЗК и в условиях космического полёта. Здесь и далее горизонтальные линии указывает на столбцы с достоверно различающимися показателями (P < 0,05; U-критерий Манна-Уитни-Вилкоксона).

Миелообразующие клетки

Olig2-иммунопозитивные клетки. У животных полётной и восстановленной групп количество иммунопозитивных клеток во всех зонах незначительно уменьшается по

сравнению с соответствующими контрольными группами (рисунок 4А). Достоверный сдвиг зарегистрирован только в CST в паре сравнения полётной и контрольной полётной групп, с преобладанием данного показателя в контроле (рисунок 4Б). При сравнении полётной и восстановленной групп в CST экспрессия белка Olig2 увеличивается в группе реадaptации после полёта.

А)



Б)

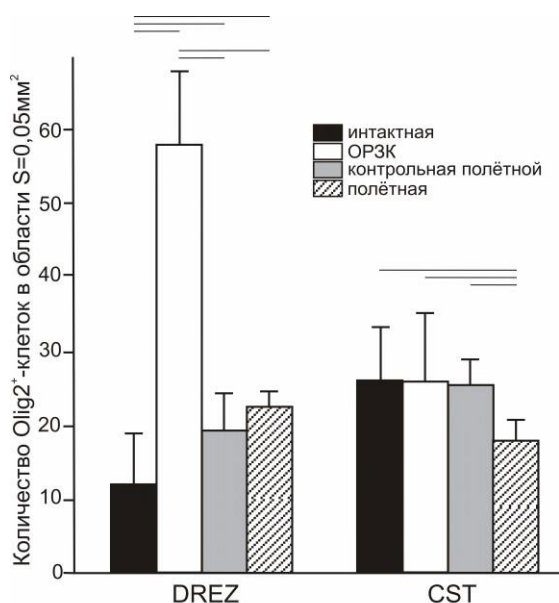


Рис. 4. Экспрессия Olig2 в клетках поясничного отдела спинного мозга у мышей в условиях ОРЗК, космического полёта и 7-суточной реадaptации на Земле после полёта (А). При ОРЗК в DREZ значительно увеличивается количество Olig2⁺-клеток. Сдвиги в этой зоне в полётной группе не обнаружены. В CST у мышей полётной группы количество Olig2⁺-клеток уменьшается (Б). Масштаб 100 мкм.

Между восстановленной группой и её контролем по данному маркеру достоверных сдвигов не обнаружено. Это может свидетельствовать о восстановлении показателя на 7 сутки реадaptации на Земле после полёта (рисунок 4А).

По количеству Olig2⁺-клеток зарегистрированы разнонаправленные сдвиги. Если в полётной группе, как уже упоминалось, количество этих клеток незначительно уменьшается, то в группе ОРЗК, наоборот, существенно возрастает. Наблюдаемые изменения особенно выражены в DREZ.

OSP-иммунопозитивные клетки. При сравнении животных полётной группы с соответствующим ей контролем установлено, что показатель плотности флуоресценции белка OSP увеличивается в зоне VF, в то время как в других зонах экспрессия данного белка остается стабильной. Наибольшая плотность флуоресценции белка OSP во всех исследуемых группах наблюдается в CST, а наименьшая в зоне CC. Различие между восстановленной и контрольной восстановленной группами по данному показателю не зарегистрировано.

В условиях космического полёта снижается экспрессия белка OSP (уменьшается флуоресцентная плотность) как в сером, так и в белом веществе. Как и у полётных мышей, при ОРЗК снижение экспрессии этого белка наблюдается во всех исследуемых зонах, что может свидетельствовать о нарушении миелинизации в спинном мозге (Furuse M. et al., 2002).

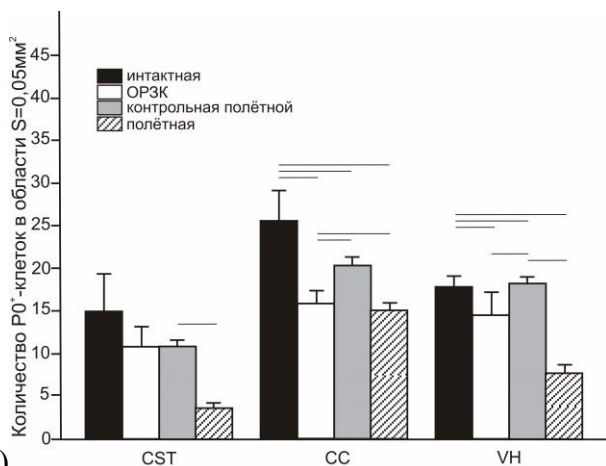
Krox20-иммунопозитивные клетки. Иммуноцитохимическая реакция на транскрипционный фактор Krox20 в спинном мозге мыши не выявила клеток, экспрессирующих данный маркер. Полученные результаты согласуются с данными Herdegen T. et al. (1993) о том, что Krox20⁺-клетки отсутствуют в спинном мозге половозрелых грызунов.

В ходе исследования в спинном мозге мыши обнаружены маркеры миелиновой оболочки ПНС – белки P0 (MPZ) и Krox24. В глиальных клетках выявлена мембранная локализация белка P0 и ядерная локализация маркера Krox24.

P0-иммунопозитивные клетки. Присутствие P0⁺-клеток в спинном мозге мыши практически не изучено и требует дополнительного исследования. В спинном мозге у животных контрольной полётной группы P0⁺-клетки были распределены неравномерно с преобладанием в зоне CC. У мышей полётной группы количество P0⁺-клеток значительно снижено в CST и VH (рисунок 5А). Аналогичная картина наблюдается при сравнении восстановленной и контрольной восстановленной групп.

В полётной и восстановленной полётной группах выявлено снижение количества P0⁺-клеток, сдвиги в большинстве исследуемых зон однонаправлены и одинаково выражены. Исключение составляют зоны CC и VF в паре сравнения восстановленной и контрольной восстановленной групп. Изменения количества иммунопозитивных клеток в группах ОРЗК и интактных животных соответствуют выраженности и направленности сдвигам, зафиксированным в полётной и контрольной полётной группах.

А)



Б)

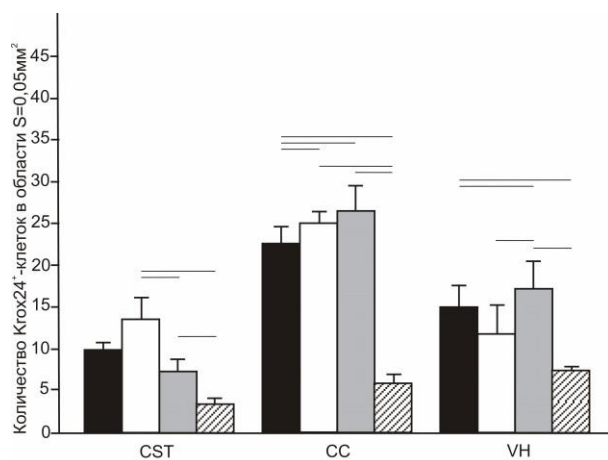


Рис. 5. Количество P0⁺ (А) и Krox24⁺ (Б) клеток в поясничном отделе спинного мозга у мышей в условиях ОРЗК и космического полёта на 30 сутки в зонах CST, CC и VH.

Белок P0 является важным компонентом миелина, регулирующим укладку слоев миелиновой оболочки. Нарушение экспрессии белка P0 приводит к дефектам миелинизации при космическом полёте и симуляции невесомости на Земле. При ОРЗК показано снижение экспрессии миелинспецифичных генов *mp2* и *mp22* (Исламов Р.Р. и соавт., 2014), кодирующих белки, которые участвуют в образовании и стабилизации миелиновой оболочки. Полученные данные по экспрессии маркеров миелинообразующих клеток в спинном мозге согласуются с представлением о присутствии белков Krox24, P0 и p75 не только в структурах периферической нервной системы, но и в ЦНС (Jasmin L. et al., 2000; Nagoshi L. et al., 2011).

Krox24-иммунопозитивные клетки. Показано достоверное различие по количеству Krox24⁺-клеток в сером и белом веществе при сравнении животных полётной и контрольной полётной групп. Количество Krox24⁺-клеток уменьшается в группе с полётными животными в зоне CST, CC и VH в 1,8, 4,3 и 2,3 раза, соответственно (рисунок 5Б). В паре сравнения восстановленной и контрольной восстановленной групп не зарегистрировано изменений по

экспрессии данного маркера ни в одной из исследуемых зон. Отмечены однонаправленные сдвиги в восстановленной и полётной группах, в восстановленной группе наблюдается значительное снижение количества Krox24⁺-клеток в белом веществе (VF и CST). При сравнении мышей с ОРЗК и полётной группы выявлены разнонаправленные сдвиги в количестве Krox24⁺-клеток, наибольшие изменения зарегистрированы в группе ОРЗК. У мышей группы ОРЗК количество Krox24⁺-клеток увеличено в каждой из исследуемых зон. Транскрипционный фактор Krox24 относится к белкам раннего ответа, участвует в регуляции клеточного цикла, дифференцировке миелинообразующих клеток и индуцируется влияниями со стороны нейронов. Снижение экспрессии этого белка может быть следствием нарушения взаимоотношений между нейронами и глией.

P0/Krox24-иммунопозитивные клетки. Между полётной и контрольной полётной группами по данному показателю достоверное различие обнаружено только в белом веществе (VF и CST) с преобладанием количества P0⁺/Krox24⁺-клеток у животных контрольной полётной группы. При сравнении восстановленной и контрольной восстановленной групп не отмечено достоверной разницы ни в одной из зон подсчёта. В восстановленной группе не зарегистрировано восстановления количества P0⁺/Krox24⁺-клеток, что может быть связано с недостаточно длительным периодом наблюдений для восстановления этого параметра.

При сравнении групп ОРЗК и интактных мышей изменения в количестве P0⁺/Krox24⁺-клеток аналогичны сдвигам в полётной группе. В сером веществе у животных с ОРЗК эти сдвиги выражены в большей мере. В белом веществе наиболее заметные различия по этому показателю зафиксированы в паре сравнения полётной и контрольной полётной групп.

Таким образом, в условиях моделирования гипогравитации на Земле и космического полёта в поясничном утолщении спинного мозга мышей обнаружены изменения иммуногистохимических характеристик миелинообразующих клеток. Наиболее выраженные изменения зафиксированы в белом веществе. Отсутствие изменений количества P0⁺/Krox24⁺-клеток в паре сравнения восстановленной и контрольной восстановленной групп даёт основание полагать, что выявленные сдвиги не являются необратимыми и имеют тенденцию к восстановлению в период 7 суточной реадаптации на Земле после космического полёта.

Микроглия

Iba1-иммунопозитивные клетки. Маркер Iba1 обнаруживает покоящиеся и реактивные клетки микроглии. В паре сравнения полётной и контрольной полётной групп зафиксирована достоверная разница во всех зонах подсчёта. Количество Iba1⁺-клеток у

животных полётной группы увеличивается в среднем в 2,5 раза как в сером, так и в белом веществе. В восстановленной группе достоверное увеличение количества Iba1⁺-клеток зарегистрировано только в DREZ. В восстановленной группе во всех зонах сохраняется тенденция увеличения количества клеток, экспрессирующих белок Iba1, но она выражена в меньшей мере, чем у полётных мышей, что может свидетельствовать о восстановлении этого показателя.

У интактных мышей Iba1⁺-микроглия однородно распределена в каждой исследуемой зоне спинного мозга. У мышей с ОРЗК количество Iba1⁺-клеток достоверно увеличивается в зоне СС и DREZ. Изменения количества иммунопозитивных клеток в группе мышей с ОРЗК соответствуют выраженности и направленности сдвигам, зарегистрированным в группе полётных животных.

Микроглия выделяет протеазы и цитокины, которые могут повреждать нейральные клетки и вызывать демиелинизацию аксонов. Активация микроглии является одним из ведущих механизмов в патогенезе нейродегенеративных заболеваний (Roser A.E. et al., 2017) и нейротравмы (Anwar M.A. et al., 2016). Представляется достаточно вероятным, что подобные реакции со стороны микроглии могут быть причиной негативных изменений морфо-функционального состояния мотонейронов и клеток макроглии при гипогравитационном двигательном синдроме.

Шейный отдел спинного мозга

Астроциты

На 30 сутки в полётной группе количество GFAP⁺-клеток увеличивается только в DREZ в 1,8 раза при сравнении с контрольной полётной группой. Достоверные различия между восстановленной и контрольной восстановленной группами по экспрессии GFAP не выявлены. В этой же зоне в группе животных с ОРЗК показано увеличение количества GFAP⁺-клеток.

При ОРЗК снижение количества S100B⁺-клеток обнаружено в VH и VF, в полётной группе – только в VH. В группе с 7 дневным периодом реадaptации на Земле S100B⁺-клетки распределены равномерно по всем исследуемым зонам, достоверных различий по этому показателю в восстановленной группе при сравнении с контрольной восстановленной группы не выявлено.

Численность GFAP⁺/S100B⁺-астроцитов не изменяется ни при космическом полёте, ни под воздействием ОРЗК. Таким образом, оценка экспрессии GFAP и S100B показала, что влияние космического полёта на популяцию астроцитов в шейном утолщении спинного мозга мыши минимально. Выявленные сдвиги в количестве GFAP⁺- и S100B⁺-клеток в

шейном утолщении спинного мозга мыши при ОРЗК могут быть связаны с изменением характера сократительной функции мышц. Представляется достаточно вероятным, что в условиях, моделирующих гипогравитацию на Земле, т.е. при разгрузке задних конечностей, происходит повышение тонуса мышц передней части тела животного, которое может быть причиной изменений в системе «нейрон – глия» в шейном утолщении спинного мозга.

Миелинообразующие клетки

В шейном утолщении спинного мозга в полётной группе $P0^+$ -клетки равномерно распределены по зонам подсчёта, количество $P0^+$ -клеток снижается в DREZ при сравнении с контрольной полётной группой. При ОРЗК количество $P0^+$ -клеток снижается в DREZ и СС в 1,2 и 1,6 раза, соответственно, в других зонах достоверных сдвигов не обнаружено (рисунок 6). Достоверные различия между восстановленной и контрольной восстановленной группами не зарегистрированы.

Количество $Krox24^+$ -клеток снижается в DREZ при ОРЗК и в полётной группе при сравнении данного показателя с соответствующими контрольными группами. В группе с 7 дневным периодом реадaptации на Земле $Krox24^+$ -клетки распределены неравномерно по зонам подсчёта, в белом веществе мышей восстановленной и контрольной восстановленной групп $Krox24^+$ -клеток не обнаружено, достоверных различий между данными группами не выявлено. По количеству $P0^+/Krox24^+$ -клеток в зонах серого и белого вещества не зарегистрированы достоверные сдвиги ни в одной из экспериментальных групп.

В шейном утолщении спинного мозга мышей в полётной группе в DREZ экспрессия $Olig2$ достоверно снижается. При ОРЗК $Olig2^+$ -клетки распределены неравномерно, их наибольшее количество обнаружено в DREZ, также как и в полётной группе. Это свидетельствует об однонаправленных сдвигах в количестве $Olig2^+$ -клеток, происходящих в спинном мозге мышей при реальной гипогравитации и её симуляции на Земле. При сравнении восстановленной и полётной групп в большинстве исследуемых зон сдвиги в количестве $Olig2^+$ -клеток однонаправлены, однако менее выражены. В восстановленной группе, также как и в других экспериментальных группах, выявлено увеличение количества $Olig2^+$ -клеток в DREZ.

На 30 сутки в полётной группе показатель флуоресцентной плотности OSP меньше по сравнению с контрольной полётной группой. При ОРЗК выявлено снижение флуоресцентной плотности OSP в DREZ и СС. При этом в полётной группе данный показатель ниже, чем в группе ОРЗК. Достоверное различие между полётной и ОРЗК группами по экспрессии OSP выявлено в VH. Между восстановленной и контрольной восстановленной группами по этому показателю достоверных различий не обнаружено.

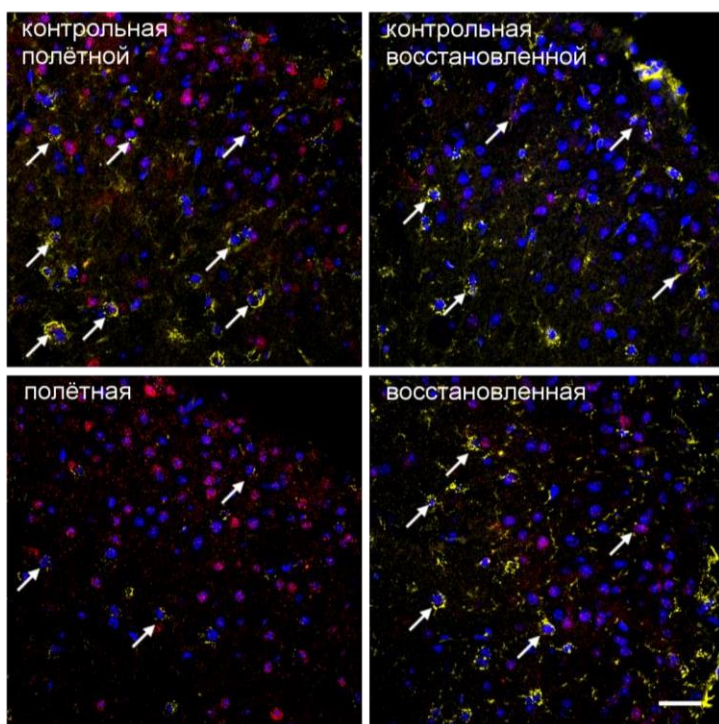


Рис. 6. DREZ в шейном отделе спинного мозга у мышей в условиях космического полёта и 7-суточной реадaptации на Земле. Количество P0⁺- (красный) и Krox24⁺- (зелёный) клеток увеличивается в восстановленной группе при сравнении с полётной группой. Выявлена колокализация белков P0 и Krox24; P0⁺/Krox24⁺-клетки отмечены стрелкой. Ядра визуализированы с DAPI (синий). Масштаб 100 мкм.

Сдвиги в экспрессии белков миелина в шейном утолщении при ОРЗК свидетельствуют об изменении характера двигательной активности мыши, которое, вероятно, является причиной морфо-функциональных сдвигов со стороны миелинообразующих клеток.

Белок щелевого контакта Cx47 экспрессируется преимущественно в олигодендроцитах в сером веществе и в S100B⁺-астроцитах в белом веществе (Odermatt B. et al., 2003). В исследовании Menichella D.M. et al. (2003) на трансгенных мышах, мутантных по гену *cx47* (Cx47-null), показано, что продукт данного гена не влияет на миелинизацию в спинном мозге, но участвует в межклеточном взаимодействии между олигодендроцитами и астроцитами.

В полётной и контрольной полётной группах Cx47⁺-клетки равномерно распределены по всем изученным зонам, наибольшее их количество обнаружено в условиях космического полёта. В группе ОРЗК количество Cx47⁺-клеток увеличивается в DREZ и СС в 1,5–2 раза. На 7 суток реадaptации на Земле после космического полёта изменения в численности Cx47⁺-клеток зарегистрированы только в DREZ.

Пребывание мышей в течение 30 суток в условиях ОРЗК и космического полёта приводит к снижению экспрессии маркеров миелинообразующих клеток в шейном утолщении

спинного мозга, что дополняет картину патогенеза гипогравитационного двигательного синдрома. Увеличение количества Сх47⁺-клеток соответствует сдвигам, происходящим в популяции астроцитов и олигодендроцитов. Представляется весьма вероятным, что возрастание экспрессии Сх47 отражает процесс усиления межклеточной коммуникации в глии. Увеличение экспрессии маркеров миелинообразующих клеток на 7 сутки реадaptации на Земле после космического полёта свидетельствует о восстановлении отклоняющихся показателей, подтверждает достоверность изменений иммуноцитохимических параметров миелинообразующих клеток в ходе собственно космического полёта и указывает на потенциальную возможность достаточно быстрой нормализации патологических отклонений в миелиновых волокнах при гипогравитационном двигательном синдроме.

Микроглия

В группе ОРЗК, полётной и восстановленной полётной группах Iba1⁺-клетки в шейном утолщении спинного мозга мыши имеют как округлую форму без отростков, так и неправильную отростчатую. В соответствующих контрольных группах выявлены в основном клетки округлой формы. Различие в морфологии клеток микроглии спинного мозга свидетельствует об их реакции на гипогравитацию.

В полётной группе количество Iba1⁺-клеток увеличивается во всех зонах подсчёта. В белом веществе их количество возрастает в 2–3 раза по сравнению с контрольной полётной группой. В сером веществе наибольший прирост наблюдается в зоне СС, где количество Iba1⁺-клеток увеличивается в 9,2 раза.

В группе ОРЗК наблюдается достоверное увеличение числа Iba1⁺-клеток как в зонах серого (DREZ и СС), так и белого (VF и CST) вещества. Клетки по зонам подсчёта распределены неравномерно с преобладанием в VF, наименьшее количество Iba1⁺-клеток обнаружено в DREZ. При сравнении групп ОРЗК и космического полёта выявлено достоверное увеличение числа Iba1⁺-клеток в полётной группе во всех зонах подсчёта, кроме VF. В среднем в полётной группе количество Iba1⁺-клеток в 2,5 раза больше, чем в группе ОРЗК. При этом количество клеток с неправильной отростчатой формой преобладает в полётной группе.

Достоверные различия между восстановленной и контрольной восстановленной группами зарегистрированы только в зоне СС. Здесь в восстановленной полётной группе количество Iba1⁺-клеток в 2 раза превышает их количество в контрольной восстановленной группе. В остальных зонах подсчёта достоверных изменений в количестве Iba1⁺-клеток не выявлено.

Особый интерес представляет одна из субпопуляций клеток микроглии, происходящих из костного мозга и экспрессирующих гомеобоксный ген *hoxb8* (Chen S.K. et

al., 2010). У мутантных по этому гену мышей имеются дефекты чувствительности, в первую очередь ноцицепции, и нарушение поведенческих реакций, которые связывают с клетками микроглии именно этой субпопуляции (Holstege J.C. et al., 2008; Schlegelmilch T. et al., 2011). Не исключено, что подобные нарушения функции могут наблюдаться в условиях невесомости.

В спинном мозге животных контрольных и экспериментальных групп НохВ8⁺-клетки были выявлены только в дорсальной части серого вещества в области СС и DREZ. В полётной группе количество НохВ8⁺-клеток увеличивается в 3,4 и 1,6 раз в DREZ и СС, соответственно. Сдвиги в ОРЗК и полётной группах однонаправлены и наиболее выражены в полётной группе. Достоверные различия по этому показателю между восстановленной и контрольной восстановленной группами не выявлены, количество НохВ8⁺-клеток соответствует значениям в аналогичных зонах спинного мозга у интактных мышей и контрольной полётной группы. У мышей группы ОРЗК количество НохВ8⁺-клеток возрастает в 3–4 раза по сравнению с интактными животными. Изменение характера подвижности животного в сочетании с воздействием стресса при ОРЗК являются причиной значительного увеличения количества клеток микроглии в шейном утолщении спинного мозга.

Микроглия может активироваться при стрессе, воздействии перегрузки, радиации, невесомости и т.п. У полётных мышей значительное увеличение количества Iba1⁺-клеток может быть связано с синергическим действием этих факторов в условиях космического полёта. Результаты подсчёта клеток микроглии в восстановленной группе свидетельствуют о восстановлении данного показателя в условиях реадаптации животных на Земле. Таким образом, активация микроглии при ОРЗК и при космическом полёте является одним из факторов в патогенезе гипогравитационного двигательного синдрома.

Выводы:

1. Пребывание мышей в течение 30 суток в условиях космического полёта или при опорной разгрузке задних конечностей приводит к изменениям количества GFAP⁺-, S100B⁺-, GFAP⁺/S100B⁺-астроцитов в поясничном и шейном утолщении спинного мозга.
2. В условиях космического полёта и при опорной разгрузке задних конечностей наблюдаемые сдвиги в фенотипе глиальных клеток в шейном отделе спинного мозга мыши аналогичны, но менее выражены, чем в поясничном отделе.
3. В условиях космического полёта и опорной разгрузки задних конечностей в поясничном утолщении спинного мозга мышей зарегистрировано уменьшение количества миелинообразующих клеток, экспрессирующих OSP, Olig2, P0 и Krox24.

4. Увеличение экспрессии маркеров и количества миелинообразующих клеток на 7 сутки реадaptации на Земле после космического полёта свидетельствует о восстановлении отклоняющихся показателей и указывает на потенциальную возможность достаточно быстрой нормализации патологических отклонений в миелиновых волокнах при гипогравитационном двигательном синдроме.
5. В условиях космического полёта и опорной разгрузки задних конечностей увеличивается количество Iba1⁺- и НохВ8⁺-клеток в поясничном и шейном утолщении спинного мозга, что свидетельствует об активации микроглии при воздействии реальной и симулируемой на Земле невесомости и является одним из ключевых факторов в патогенезе гипогравитационного двигательного синдрома.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. *Повышева Т.В.* Цитохимическая характеристика глии спинного мозга при опорной разгрузке задних конечностей мыши / Т.В. Повышева // *Материалы XX Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов».* – Москва, 2013. – [Электронный ресурс], http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2013/2339/55847_38a3.pdf.

2. *Повышева Т.В.* Иммуногистохимический анализ поведения олигодендроцитов при гипогравитационном двигательном синдроме / Т.В. Повышева, Я.О. Мухамедшина // *Материалы XXI Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов».* – Москва, 2014. – [Электронный ресурс], http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2014/2736/2200_71352_b40ed9.pdf.

3. Мухамедшина Я.О. Астроциты и микроглия спинного мозга мыши в условиях опорной разгрузки задних конечностей / Я.О. Мухамедшина, Т.В. Повышева, М.В. Нигметзянова, О.В. Тяпкина, Р.Р. Исламов, Е.Е. Никольский, Ю.А. Челышев // Доклады академии наук. Серия Физиология. – 2014. – Т.456, №2. – С. 114–116.

4. *Muhamedshina Y.O.* Glia of mouse spinal cord in hindlimb unloading model and space flight / Y.O. Muhamedshina, T.V. Povysheva, Y.A. Chelyshev, R.R. Islamov // *Abstracts of The 40th COSPAR Scientific Assembly*. – Moscow, 2014. – [Electronic resource], <https://www.cospar-assembly.org/user/download.php?id=13265&type=abstract§ion=congressbrowser>.

5. Chelyshev Y.A. Characterization of spinal cord glial cells in a model of hindlimb unloading in mice / Chelyshev Y.A., Muhamedshina Y.O., Povysheva T.V., Shaymardanova G.F., Rizvanov A.A., Nigmatzyanova M.V., Tiapkina O.V., Bondarenko N.I., Nikolskiy E.E., Islamov R.R. // *Neuroscience*. – 2014. – V.280, №1. – P. 328–339.

6. *Повышева Т.В.* Реакция шванновских клеток поясничного отдела спинного мозга мыши при развитии гипогравитационного двигательного синдрома / Т.В. Повышева // *Сборник тезисов 89-ой Международной молодёжной научно-практической конференции студенческой научно-практической конференции – Казань, 2015. – С. 260.*

7. *Повышева Т.В.* Реакция астроцитов и олигодендроцитов спинного мозга мыши в условиях космического полёта и опорной разгрузки задних конечностей / Т.В. Повышева // *Материалы XXII Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов».* – Москва, 2015. – [Электронный ресурс], https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2015/data/7003/uid55847_report.pdf.

8. *Повышева Т.В.* Исследование миелинообразующих клеток при гипогравитационном двигательном синдроме / Т.В. Повышева // *Сборник материалов VIII Всероссийского с*

международным участием конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2015». – Новосибирск, 2015. – С. 124.

9. *Повышева Т.В.* Реакция миелообразующих клеток глии спинного мозга мыши в условиях космического полёта и опорной разгрузки задних конечностей / Т.В. Повышева // Материалы XI Международной научно-практической конференции 10–12 ноября 2015 года «Пилотируемые полёты в космос». – Звездный городок, 2015. – С. 173–175.

10. *Повышева Т.В.* Влияние факторов космического полёта на миелообразующие клетки глии спинного мозга мыши C57BL/6 / Т.В. Повышева, Ю.А. Челышев // Материалы III межвузовской научно-практической конференции молодых учёных «Молодёжь и медицинская наука». – Тверь, 2015. – С. 248–249.

11. *Повышева Т.В.* Роль миелообразующих клеток в патогенезе развития гипогравитационного двигательного синдрома / Т.В. Повышева // Материалы Международной конференции «Пилотируемое освоение космоса». – Москва, 2016. – С. 105.

12. Повышева Т.В. Миелинизированные волокна спинного мозга мыши после 30-суточного космического полёта / Т.В. Повышева, П.Н. Резвяков, Г.Ф. Шаймарданова, Е.Е. Никольский, Р.Р. Исламов, Ю.А. Челышев, Григорьев А.И. // Доклады академии наук. Серия Физиология. – 2016. – Т.469, №6. – С. 756–759.

13. Повышева Т.В. Влияние космического полёта на глиальные клетки мыши / Т.В. Повышева, Ю.А. Челышев // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2016. – Т.50, №6 – С. 45–50.

Список сокращений

ОРЗК	опорная разгрузка задних конечностей
СС	центральный канал
CST	кортикоспинальный тракт
Cx47	белок щелевых контактов коннексин 47
DREZ	зона вхождения дорсальных корешков
GFAP	глиальный фибриллярный кислый белок
HoxB8	белок гомеобокса B8
Iba1	кальций-связывающий белок микроглии
Krox20	транскрипционный фактор, белок раннего ответа 2
Krox24	транскрипционный фактор, белок раннего ответа 1
Olig2	транскрипционный фактор олигодендроцитов 2
OSP	олигодендроцит-специфический белок
P0	нулевой белок миелина
S100B	кальций-связывающий белок S100B
VF	вентральный канатик
VH	вентральный рог