

# ВЛИЯНИЕ РАЗГРУЗКИ ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ НА МИЕЛИНИЗАЦИЮ И ЭКСПРЕССИЮ АННЕКСИНА V И АГРИНА В ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ И СМЕШАННОЙ ВЕТВЯХ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА МЫШИ

## EFFECT OF HIND LIMB UNLOADING ON MYELINATION AND EXPRESSION OF ANNEXIN V AND AGRIN IN THE SENSITIVE AND MIXED BRANCHES OF THE SCIATIC NERVE OF THE MOUSE

**G. Shaymardanova  
V. Salnikov  
A. Vasilyeva  
I. Gaysin**

*Summary.* Data were obtained on shifts in the state of myelinated fibers of the sciatic nerve of the mouse after 30-day anti-orthostatic hanging in comparison with the control group under normal vivarium conditions. The response of the sensitive and mixed nerve branches to the experimental conditions is characterized by Transmission Electron microscopy. Changes affect both types of nerves and are qualitatively similar, consisting in a relative decrease in the number of fibers with thin myelin and the appearance of fibers with excessive myelination. The results of quantitative immunohistochemistry also indicate differences in the expression of agrin and annexin V — proteins involved in the regulation of membrane processes. Pronounced decrease in agrin expression was noted in the sensory branch, relative to increase in the mixed branch. At the same time, differences in the expression of annexin V between the functionally different sciatic nerve compartments, as well as in the comparison of control and experience, are within the error.

On average, changes in the sensitive branch are more pronounced compared to the mixed branch, which may be a consequence of the advanced response of sensitive neurons to hypogravity.

*Keywords:* immunoelectron microscopy, myelin, agrin, annexin, sciatic nerve.

**Шаймарданова Гульнара Фердинантовна**

Д.б.н., в.н.с., Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»  
gulnara-f-kzn@mail.ru

**Сальников Вадим Владимирович**

Д.б.н., профессор, Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»; Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

**Васильева Алина Рустемовна**

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Гайсин Ильшат Альбертович**

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

*Аннотация.* Получены данные о сдвигах в состоянии миелинизированных волокон седалищного нерва мыши после 30-суточного антиортостатического вывешивания в сравнении с контрольной группой, находившейся в обычных условиях вивария. Охарактеризована реакция чувствительной и смешанной ветвей нерва методом трансмиссионной электронной микроскопии. Изменения затрагивают оба типа нервов и носят качественно сходный характер, заключающийся в относительном уменьшении числа волокон с тонким миелином и появлении волокон с избыточной миелинизацией. Результаты количественной иммуногистохимии свидетельствуют также о различиях в экспрессии агрина и аннексина V — белков, вовлеченных в регуляцию мембранных процессов. В сенсорной ветви отмечено уменьшение экспрессии агрина, а в смешанной — увеличение. В то же время, различия в экспрессии аннексина V между функционально разными компартментами седалищного нерва, а также при сравнении контроля и опыта находятся в пределах погрешности.

В среднем, изменения в чувствительной ветви более выражены по сравнению со смешанной, что может быть следствием опережающей реакции чувствительных нейронов на гипогравитацию.

*Ключевые слова:* иммуноэлектронная микроскопия, миелин, агрин, аннексин, седалищный нерв.

## Введение

Одним из проявлений воздействия невесомости на человека является развитие гипогравитационного двигательного синдрома (ГДС), который характеризуется нарушениями во всех звеньях двигательной системы. Но если мышечный аспект ГДС исследован всесторонне и подробно, то изменения в центральной (ЦНС) и периферической нервных системах изучены недостаточно. Лишь относительно недавно получены существенные свидетельства того, что ЦНС играет ключевую роль в запуске и развитии ГДС [Islamov 2015, Nagatomo 2014]. Однако конкретные механизмы этого влияния и источники адаптивных реакций со стороны периферической нервной системы остаются неясными. Первые исследования морфологии аксонов седалищного нерва мыши в условиях разгрузки задних конечностей появились только в 2009 году [4].

Необходимость в раздельном изучении морфологических характеристик двигательных и сенсорных волокон периферических нервов возникает при анализе причин различных двигательных расстройств. 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. В этой связи представляет интерес сопоставительное изучение морфологических характеристик двигательных и сенсорных волокон периферических нервов.

В ряде недавних работ [Wang 2011, Meng 2011] был поставлен вопрос о специфичности экспрессии аннексина V и агрина в чувствительных и двигательных волокнах седалищного нерва. Аннексин V выполняет множественные функции в организме и вырабатывается различными тканями, проявляя высокое сродство к мембранным липидам, в особенности фосфатидилсерину. Агрин, согласно данным ряда исследований, синтезируется в нейрональных телах двигательных нейронов и транспортируется к нервным окончаниям, где затем секретируется во внеклеточное пространство, участвуя в образовании и поддержании целостности синаптических контактов. Методами световой микроскопии и иммуногистохимии было показано, что агрин присутствует в волокнах обоих типов, а аннексин V — преимущественно в чувствительных [Saito 1995]. Данные об ультраструктурной локализации аннексина V и агрина в литературе отсутствуют. В настоящей работе мы изучили возможность использования этих белков для маркирования чувствительных и двигательных волокон в смешанной ветви седалищного нерва мыши при электронномикроскопических исследованиях.

Для исследования использовали участки большеберцовой и кожной ветви седалищного нерва. Мы исходили из того, что в кожной ветви представлены исключительно чувствительные волокна, а в большеберцовой — и двигательные, и чувствительные [Badia 2010].

Материалы  
и методы

Эксперименты выполнены на белых мышах самцах массой  $25 \pm 3$  г. Все процедуры с животными проводили в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского Национального комитета по биоэтике. Животные были разделены на две группы: контрольную ( $n = 12$ ) и опытную ( $n = 12$ ). У животных подопытной группы моделировали гипогравитацию методом антиортостатического вывешивания задних конечностей [5]. Животных контрольной группы содержали в стандартных условиях вивария. На 30-е сутки эксперимента животных наркотизировали, перфузировали 4% раствором параформальдегида (pH 7,4). Для исследования использовали участки большеберцовой и кожной ветви седалищного нерва. Нервы выделяли и фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде и 1% растворе OsO<sub>4</sub> на фосфатном буфере с добавлением сахарозы и заливали в Epon 812 (Fluka) для морфометрии, и в LRWhite — для иммуногистохимии. Поперечные срезы изготавляли на ультрамикротоме LKB-III, контрастировали насыщенным водным раствором уранил-ацетата и цитратом свинца и просматривали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1200 и Hitachi HT 7700. Измеряли наружный диаметр миелиновых волокон и аксональных цилиндров.

Проведение иммуногистохимических реакций осуществляли по классической схеме для работы с первичными и вторичными антителами с собственными модификациями [1; 2]. В качестве первичных антител использовали коммерческие поликлональные антитела, специфичные к Агрину (Rabbit anti-mouse polyclonal Agrin antibody, ab85174, Abcam), и к Аннексину V (Rabbit anti-mouse polyclonal Annexin V antibody, ab14176, Abcam). Использовали вторичные антитела, конъюгированные с коллоидным золотом (Anti-Rabbit Goat, Sigma, размер частиц 5 нм). Для усиления сигнала коллоидного золота применяли процедуру усиления метки серебром [3], для чего сетки со срезами инкубировали 4 минуты в растворе (BBInternational Silver Enhancing Kit, Ted Pella, Inc., Redding, CA).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета прикладных программ Origin 8.0 с использованием t-критерия Стьюдента. Уровень достоверности был принят меньше 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

Таблица 1. Средние значения отношения  $g$  в большеберцовой и кожной ветвях седалищного нерва контрольной и опытной групп мышей.

	$g = d / D$
Контроль, большеберцовая ветвь	$0,829 \pm 0,018$
Опыт, большеберцовая ветвь	$0,802 \pm 0,036$
Контроль, кожная ветвь	$0,788 \pm 0,029$
Опыт, кожная ветвь	$0,656 \pm 0,046$

$D$  — внешний,  $d$  — внутренний (аксональный) диаметры миелинового волокна.

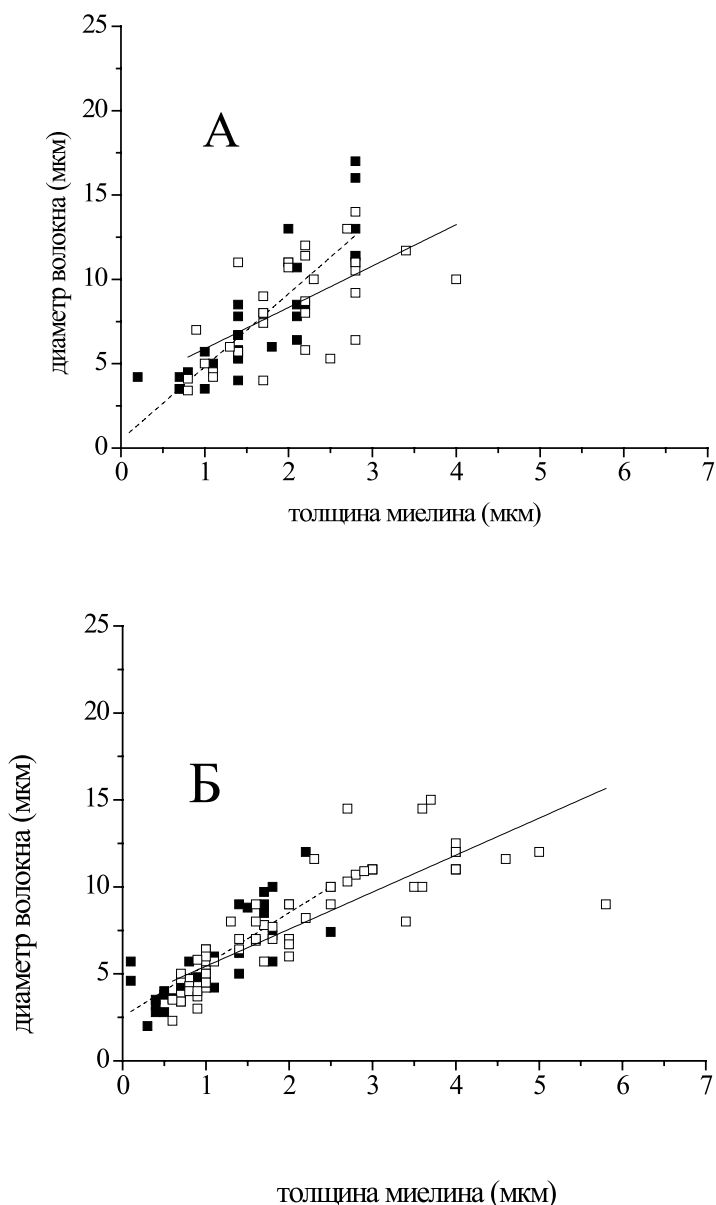


Рис. 1. Корреляция между толщиной миелиновых оболочек и диаметром миелинизированного волокна в большеберцовой (А) и кожной (Б) ветвях седалищного нерва. Темные символы — контроль, светлые — опыт. По оси абсцисс — толщина миелина, по оси ординат — диаметр миелиновых волокон. Значения коэффициентов Пирсона для А:  $R = 0,73$  (контроль, штриховая линия),  $R = 0,64$  (опыт, сплошная линия); для Б:  $R = 0,8$  (контроль, штриховая линия),  $R = 0,72$  (опыт, сплошная линия).

Таблица 2. Плотность точек иммунопреципитата по агрину и аннексину V в кожной и большеберцовой ветвях седалищного нерва мыши.

	Плотность точек, $\mu\text{км}^{-2}$	
	Опыт	Контроль
Агрин, большеберцовая ветвь	$25,54 \pm 5,46$	$14,93 \pm 1,85$
Агрин, кожная ветвь	$19,81 \pm 3,01$	$34,33 \pm 4,63$
Аннексин V, большеберцовая ветвь	$5,84 \pm 1,26$	$4,88 \pm 1,09$
Аннексин V, кожная ветвь	$3,19 \pm 0,96$	$4,38 \pm 1,35$

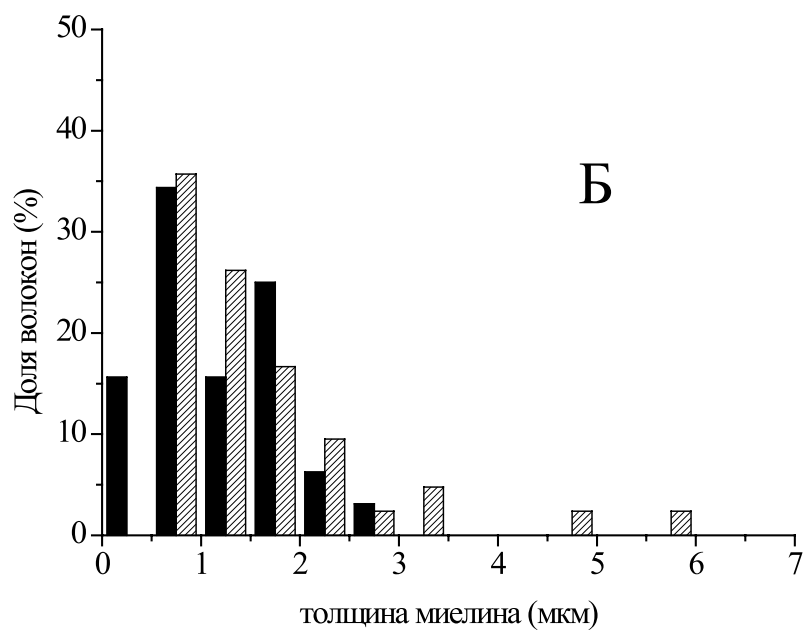
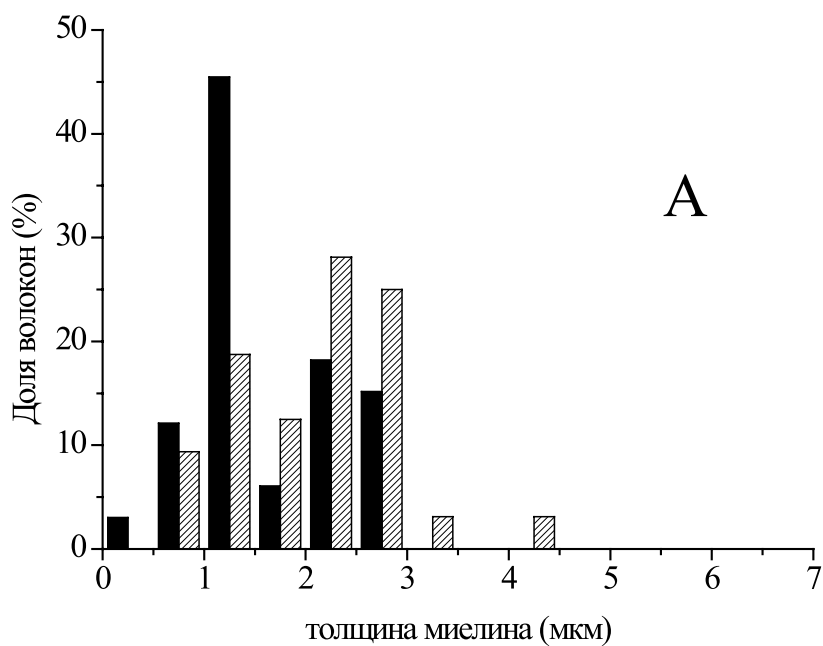


Рис. 2. Распределение волокон по толщине миелина в большеберцовой (А) и кожной (Б) ветвях седалищного нерва. Контроль — темная штриховка, опыт — светлая.

## Результаты

Морфологически волокна опытных образцов обеих ветвей выглядят достаточно сохранными, не обнаруживая заметных качественных различий с образцами от животных контрольной группы. В образцах от интактных животных наблюдается пропорциональность между диаметром волокна и толщиной миелина: волокна большего диаметра имеют и более толстый миелин (Рис. 1). Однако в опытных образцах появляется пул волокон с очень толстым миелином при сравнительно малом диаметре волокон. Число таких волокон особенно велико в чувствительной ветви, что приводит к достоверному снижению среднего значения индекса  $g$ , характеризующего относительную толщину миелиновой оболочки (Табл. 1).

Под влиянием вывешивания меняются не только средние значения индекса, но и характер распределения индивидуальных волокон по толщине миелина (Рис. 2). В контрольных образцах основное количество волокон имеет толщину миелина около 0,8–2 мкм, при этом имеется значительное число волокон с более тонким миелином. В опытных образцах волокна с миелином тоньше 0,5 мкм не наблюдаются вообще, зато появляется длинный хвост в сторону больших значений — от 3 до 5,5 мкм. Подобный характер изменений позволяет сделать вывод, что толщина миелина увеличивается во всех волокнах, но в разной степени. При этом, в кожной ветви относительный прирост существенно больше, чем в большеберцовой.

Результаты иммуногистохимии свидетельствуют, что антитела к агрину и аннексину V сорбируются предпочтительно на миелиновых оболочках нервных волокон. Плотность преципитации максимальна на плотных слоях миелина и незначительна на участках расслоения миелина. В то же время, иммуносорбция в аксональных цилиндрах, в безмиелиновых волокнах, а также на коллагене отсутствует или незначительна. Сравнение контрольных образцов большеберцовой и кожной ветвей по плотности и равномерности распределения осадка показало, что осадок по аннексину V распределяется равномерно по миелиновым оболочкам волокон в обеих ветвях (Табл. 2). Сравнение между контролем и опытом также показало незначительные отличия по аннексину V. В то же время, по агрину наблюдается существенная разница в плотности осадка — в кожной ветви плотность более чем в два раза выше по сравнению с большеберцовой. Под влиянием вывешивания экспрессия агрина в кожной ветви уменьшается, а в большеберцовой увеличивается.

## Обсуждение

Проблема гистохимического маркирования чувствительных и двигательных волокон в составе смешанного

нерва актуальна в связи с необходимостью изучения их раздельной реакции на внешние воздействия. Для ультраструктурных исследований эта проблема остается нерешенной. В настоящей работе мы изучили специфичность экспрессии агрина и аннексина V в волокнах чувствительной (кожной) и смешанной сенсорно-моторной (большеберцовой) ветвях седалищного нерва, адаптировав методику электронной иммуногистохимии применительно к нервной ткани. Полученные нами результаты свидетельствуют, что экспрессия агрина в значительной мере определяется функциональной принадлежностью волокна, тогда как для аннексина V такой специфичности не обнаружено. Кроме того, и общий уровень окрашивания по аннексину V в волокнах обоих типов оказался существенно ниже, чем по агрину. Несмотря на то, что по агрину имеется существенная количественная разница в интенсивности окрашивания, агрин не может быть использован для селективного мечения чувствительных и двигательных нервных волокон, по причине высокой вариативности его экспрессии. Согласно полученным данным, в опытных образцах сенсорной и смешанной ветвей седалищного нерва изменения средней величины экспрессии имеют значительную величину и носят разнонаправленный характер. При этом реакция сенсорной ветви значительно более выражена по сравнению со смешанной.

Существенной чертой изменений характера миелинизации аксонов седалищного нерва в результате длительной разгрузки задних конечностей является избыточный рост толщины миелина, что выводит миелиновый индекс за пределы оптимальных значений [6]. Авторы ряда работ сообщали об увеличении толщины миелина различных отделов центральной нервной системы в процессе старения у мышей [7], крыс [8, 9] и приматов [10]. Высказывается мнение, что утолщение миелиновых оболочек является приспособительной реакцией в ответ на уменьшение числа нервных волокон путем увеличения проводимости оставшихся.

В предыдущей работе мы выявили, что в результате аналогичного по длительности вывешивания миелинизированные волокна в белом веществе поясничного отдела спинного мозга демонстрируют разрушение миелина [11]. Данные, полученные на текущем этапе исследований, показывают, что в отличие от ЦНС миелиновые оболочки периферических нервов остаются сохранными, однако изменяется соотношение между волокнами с толстым и тонким миелином. Мы отдельно охарактеризовали реакцию чувствительных и смешанных ветвей седалищного нерва на разгрузку задних конечностей. Во-первых, морфологические изменения затрагивают оба типа нервов и имеют качественно сходный характер, заключающийся в уменьшении количества волокон с тонким миелином и появлении волокон с избыточной миелинизацией. Во-вторых, количественно реакция

чувствительной ветви более выражена по сравнению со смешанной. Отмеченные различия в интенсивности изменений в чувствительных и смешанных ветвях могут быть следствием более ранней реакции чувствительных нейронов на гипогравитацию.

Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают вовлеченность в гипогравитационный

синдром периферических сенсорных нейронов и дают основания предполагать их опережающее реагирование по сравнению с двигательными.

#### Благодарности

Работа частично поддержана грантом РФФИ 17-04-01404А

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Salnikov V.V., Lukyanenko Y. O., Lederer W. J., Lukyanenko V. I. Distribution of ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. *J Muscle Res Cell Motil.* 2009, 30, 161–170.
2. Salnikov V.V., Lukyanenko Y. O., Frederick C. A., Lederer W. J., Lukyanenko V. I. Probing the Outer Mitochondrial Membrane in Cardiac Mitochondria with Nanoparticles. *Biophys J.* 2007, 92, 1058–71.
3. Baude A., Nusser Z., Molnár E., McIlhinney R.A., Somogyi P. High-resolution immunogold localization of AMPA type glutamate receptor subunits at synaptic and non-synaptic sites in rat hippocampus. *Neuroscience* 1995, V. 69, P. 1031–55.
4. Canu MH, Carnaud M, Picquet F, Goutebroze L. Activity-dependent regulation of myelin maintenance in the adult rat. *Brain Res.* 2009. V. 1252. P. 45–51.
5. Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 2002. V. 92. P. 1367–1377.
6. Chomiak T., Hu B. What Is the Optimal Value of the g-Ratio for Myelinated Fibers in the Rat CNS A Theoretical Approach. *PLoS One.* 2009. V. 4(11). P. e7754.2009.
7. Shepherd M. N. et al. Paranodal reorganization results in the depletion of transverse bands in the aged central nervous system. *Neurobiol Aging.* 2012. V. 33. № 1. P. 203.e13–203.e24.
8. Xie F. Et al. Effects of normal aging on myelin sheath ultrastructures in the somatic sensorimotor system of rats. *Mol Med Rep.* 2014. V. 10. № 1. P. 459–466.
9. Sugiyama I. et al. Ultrastructural analysis of the paranodal junction of myelinated fibers in 31-month-old-rats. *J Neurosci Res.* 2002. V. 70. № 3. P. 309–317.
10. Peters A. The Effects of Normal Aging on Myelinated Nerve Fibers in Monkey Central Nervous System. *Front Neuroanat.* 2009. V. 3. № 11. P. 459–466.
11. 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. Characterization of spinal cord glial cells in a model of hindlimb unloading in mice. *Neuroscience*, 2014, V 280, 7 Nov, P 328–339.

© Шаймарданова Гульнара Фердинантовна (gulnara-f-kzn@mail.ru), Сальников Вадим Владимирович, Васильева Алина Рустемовна, Гайсин Ильшат Альбертович.  
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Г. Казань