

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 616.8-00

ОСОБЕННОСТИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК И ГИСТОНА Н3
В ГИППОКАМПЕ И НЕОКОРТЕКСЕ КРЫС, ПЕРЕЖИВШИХ
ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ В ПРЕНАТАЛЬНОМ
ПЕРИОДЕ РАЗВИТИЯ

© 2020 г. Е. И. Тюлькова^{1,*}, Л. А. Ватаева², В. А. Стратилов¹, В. С. Барышева¹, О. В. Ветровой^{1,3}

¹ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

³ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, кафедра биохимии, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 03.04.2019 г.

После доработки 13.05.2019 г.

Принята к публикации 29.07.2019 г.

Стресс во время беременности может быть причиной структурных и функциональных изменений головного мозга плода, которые в дальнейшем приводят к формированию различных нервно-психических заболеваний, включая синдром дефицита внимания и гиперактивности, депрессию, шизофрению, аутизм и др. Среди стрессовых факторов, способных привести к нарушениям развития плода, особое место занимает пренатальный гипоксический стресс. Эпигенетические механизмы могут играть ключевую роль в развитии нарушений функциональной активности мозга, вызываемых стрессовыми воздействиями различной природы. Целью настоящей работы было изучение возрастных особенностей метилирования ДНК (meDNA) и гистона Н3 по лизинам 4 (meH3K4) и 9 (meH3K9) в клетках гиппокампа и неокортекса крыс – наиболее чувствительных к гипоксии структур мозга, вследствие воздействия тяжелой гипобарической гипоксии (180 мм рт. ст., 3 ч) или введения синтетического глюкокортикоида дексаметазона (0.8 мг/кг), моделирующего стрессорный ответ материнского организма, на 14–16-е сут пренатального онтогенеза. С использованием иммуногистохимического метода были обнаружены возрастные модификации степени meDNA и meH3K9 (но не meH3K4) у контрольных животных, а именно снижение уровня meDNA и meH3K9 у старых 18-месячных крыс по сравнению с 3-месячными. Предъявление тяжелой гипобарической гипоксии, так же, как и введение дексаметазона, на 14–16-е сут пренатального онтогенеза приводят к длительному (до 18 мес.) увеличению уровня meDNA во всех исследованных структурах мозга. При этом наблюдается прогрессирующее с возрастом снижение уровня meH3K4 – активационной модификации хроматина, в гиппокампе и неокортексе крыс. В то же время уровень meH3K9 – тормозной модификации хроматина, у животных, переживших неблагоприятные воздействия в пренатальном периоде, с возрастом снижается в меньшей степени, чем у контрольных крыс. Эти данные косвенно указывают на снижение транскрипционной активности генома пренатально стрессированных животных, что может лежать в основе длительных изменений их поведения и способности к обучению.

Ключевые слова: пренатальная гипоксия, пренатальное введение дексаметазона, мозг, метилирование ДНК, метилирование гистона Н3

DOI: 10.31857/S1027813320010197

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемиологические и клинические данные свидетельствуют о том, что стресс во время беременности может быть причиной структурных и функциональных изменений головного мозга плода, которые в дальнейшем приводят к формированию различных нервно-психических забол-

ваний, включая синдром дефицита внимания и гиперактивности, депрессию, шизофрению, аутизм и др. [1–7]. Многочисленные клинико-доклинические исследования позволили сформулировать теорию “эмбрионального происхождения болезни взрослых” [8–10], показав существенную корреляцию между неблагоприятными воздействиями на организм матери и развитием различных заболеваний в дальнейшей жизни, включая сердечно-сосудистые заболевания, диа-

* Адресат для корреспонденции: 199034, Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6; e-mail: etyulkova@yandex.ru.

бет и неврологические заболевания [11–14]. Среди стрессовых факторов, способных привести к нарушениям развития плода, особое место занимаетпренатальный гипоксический стресс [15, 16].

Механизмы влияния стрессовых воздействий на развитие мозга плода до конца не изучены, однако считается, что ключевым негативным фактором риска формирования патологии является избыточный уровень глюкокортикоидов (ГК) в организме беременной женщины. При тяжелом хроническом стрессе и длительном повышении уровня ГК в крови матери, несмотря на высокоеэффективную конверсию ГК в кортизон с помощью 11-бета-гидроксистероид-дегидрогеназы 1 типа в плаценте, значительное количество глюкокортикоидов попадают в кровоток плода и напрямую действуют на его мозг [17–19]. Воздействие ГК на плод также может быть индуцировано во время терапевтического введения синтетических ГК для ускорения созревания легких плода. Применение ГК в акушерской практике продолжается, хотя многие клинические исследования показывают, что введение ГК впренатальный период оказывает неблагоприятное влияние на познавательные способности и вызывает долгосрочные изменения в поведении детей [20–22]. В настоящее время, в связи с накоплением данных о долгосрочном влиянии введения глюкокортикоидов при беременности, в особенности на нервную систему, оправданность их применения в этот период вызывает сомнения [23, 24]. Недостаток глюкокортикоидов, также как и их избыток, может играть фатальную роль в развитии организма. Таким образом, необходимо проведение дальнейших исследований в этой области [25].

Недостаточное понимание механизмов влияния стрессовых воздействий на развивающийся организм требует изучения в экспериментальных моделях на животных. Результаты модельных экспериментов подтверждают клинические наблюдения, касающиеся влияния стрессовых факторов на формирование мозга и поведения. Так, в наших предыдущих исследованиях были выявлены нарушения формирования оборонительного поведения у крыс, подвергшихся воздействию дексаметазона или гипоксии впренатальный период. Было установлено, что характер нарушений зависит от сроков гестации, на которые приходилось воздействие стресса, и вида стресса [26].

Одним из общих механизмов, с помощью которого материнский стресс может быть связан с фенотипическими изменениями в дальнейшей жизни, является эпигенетическое программирование генов, которое играет центральную роль в определении функционального выхода информации, хранящейся в геноме. Патологические воздействия во время беременности влияют как на развитие матери, так и плода посредством изме-

нения генетических признаков индивида, приобретенных в течение нескольких поколений естественным отбором, и изменения экспрессии генов путем эпигенетических модификаций. Эпигенетические модификации регулируют экспрессию генов без изменений последовательности ДНК в основном путем метилирования собственно ДНК и ковалентными посттрансляционными модификациями гистонов, такими как ацетилирование, фосфорилирование, метилирование, убиквитинилирование, сумоилирование. Метилирование/деметилирование ДНК является основным механизмом в регуляции изменения экспрессии генов [27]. Модификация гистонов изменяет структуру хроматина, которая определяет доступность регуляторных факторов к основной ДНК [28].

Эпигенетические модификации играют значительную роль в пре- и постнатальные периоды развития, внося вклад в пластичность организма к изменяющимся условиям среды обитания, регулируя процессы пролиферации и дифференциации клеток путем активации/репрессии транскрипционных факторов и изменения экспрессии генов.

Достаточно доказательств участия эпигенетической регуляции в реакции плода на внутриутробный стресс, приводящий к долгосрочным изменениям профилей экспрессии генов, которые потенциально приводят к заболеваниям в более позднем возрасте [13, 29, 30]. Важно отметить, что как эндогенные, так и синтетические глюкокортикоиды могут вызывать эпигенетические изменения, которые оказывают влияние на развитие плода [31]. Кроме того, глюкокортикоиды могут оказывать быстрые негеномные эффекты, влияющие, например, на возбудимость нейронов или вызывающие ингибирование пролиферации нейронов, сопровождающееся неврологическими дефектами, наблюдавшимися у младенцев после хронического стресса у матерей или после лечения синтетическими глюкокортикоидами [32].

Молекулярные механизмы влияния гипоксии или других стрессорных воздействий при программировании нарушений головного мозга в течение длительного постнатального периода развития остаются в значительной степени малоизученными.

В последние годы интенсивно развивающейся областью исследований механизмов развития мозга стало изучение роли метилирования ДНК в периоде нейрогенеза. Показано, что патологические изменения внешних условий во время эмбрионального развития приводят к значительным модификациям уровня метилирования ДНК [33]. Основная функция метилирования ДНК заключается в том, чтобы транскрипционно ингибировать экспрессию генов [34, 35]. Как известно, посттрансляционные модификации гистонов также вовлече-

ны в регуляцию экспрессии генов. Так метилирование гистона Н3 по лизину 4 (meH3K4), также как ацетилирование, стимулируют транскрипцию, а метилирование по лизину 9 (meH3K9) – тормозит [36].

Ранее нами были показаны изменения уровня ацетилирования гистона Н3 по лизину 24 в гиппокампе и неокортексе взрослых крыс после предъявления им на 14–16-е сут пренатального развития тяжелой гипобарической гипоксии [37] или введения дексаметазона [38]. Представляет большой интерес проведение исследований по изучению эпигенетического статуса мозга крыс, подвергавшихся воздействиям повреждающих факторов в период пренатального онтогенеза, на разных этапах дальнейшего постнатального развития – от раннего постнатального онтогенеза до старости.

Целью настоящей работы было изучение особенностей метилирования ДНК и гистона Н3 в гиппокампе и сенсомоторной коре мозга 2-недельных, 3- и 18-месячных крыс, переживших воздействие тяжелой гипоксии или введение синтетического гормона дексаметазона в течение третьей недели пренатального онтогенеза – периода формирования исследуемых структур мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа с животными. Использовали крыс линии Вистар из “Коллекции лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России. При проведении экспериментов соблюдали требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/EEC) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы экспериментов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института Физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Животные были рождены интактными самками и самками, которых на 14–16-е сут беременности подвергали действию тяжелой гипобарической гипоксии или введению синтетического гормона дексаметазона. Для создания тяжелой гипоксии беременных самок помещали в барокамеру проточного типа при температуре от 20 до 25°C и ступенчато понижали давление до 180 мм рт. ст. (продолжительность воздействия – по 3 ч в течение 3-х сут с интервалом 24 ч между сеансами). Смертность животных в барокамере составляла 15% [39]. Синтетический гормон дексаметазон вводили внутрибрюшинно трехкратно с интервалом в сутки в течение 14–16-х сут беременности в дозе 0.8 мг/кг. При выборе дозы дексаметазона мы

учитывали данные других авторов и наши более ранние исследования [40, 41].

Крысят отлучали от кормившей их матери в возрасте 30 суток. После отлучения крысы находились в клетках размером 60 × 30 × 20 см по 6 животных в каждой. В течение всего периода проведения экспериментов крысы содержались при режиме свет : темнота 12 : 12 ч, температуре 20–23°C и при постоянном доступе к воде и пище. В настоящей работе эксперименты были поставлены на 2-недельных ювенильных животных, 3-месячных молодых половозрелых самцах с активным сперматогенезом, и 18-месячных стареющих крысах. Для каждой временной точки были использованы животные из одного помета. Воспроизводимость результатов была оценена в двух независимых экспериментах.

Иммуногистохимические исследования проводены на животных всех возрастных групп. Декапитацию крыс каждой из экспериментальных групп (по 6 крыс) для взятия головного мозга осуществляли гильотиной. После декапитации вскрывали череп, извлекали мозг, отрезали мозжечок и помещали мозг в фиксатор. Далее образцы ткани мозга обрабатывали согласно стандартному гистологическому протоколу: фиксировали в молекулярном фиксаторе FineFix (разведение: 28 мл фиксатора + 72 мл 96% этилола; Milestone, Italy) в течение 24 ч при температуре 4°C. Затем образцы промывали в проточной воде в течение 2 ч и обезвоживали, проводя через этилол возраставших концентраций (50 → 70 → 80 → 96 → 96% по 1 ч в каждом). На ночь оставляли в бутаноле. Затем материал проводили через 2 порции ксилола (по 30–40 мин), помещали в парафин (2 смены парафина, по 1 ч в каждой) в термостате при температуре 56°C и изготавливали парафиновые блоки. На ротационном микротоме (Reichert, Austria) изготавливали серийные срезы мозга во фронтальной плоскости толщиной 7 мкм на уровне 2.8–3.6 мм от брегмы. Полученные срезы монтировали на предметные стекла, обработанные полилизином.

Далее срезы депарафинизировали в ксилоле (2 смены по 5 мин) и подвергали регидратации в спиртах (96 → 96 → 96 → 70% по 5 мин в каждом). Для оценки степени ацетилирования гистона Н3 по лизину 24 использовали иммуногистохимический метод. Основные этапы метода: 1) инкубация с поликлональными кроличьими антителами к гистону Н3, метилированному по Lys4 (meH3K4, активационная модификация хроматина, антитела ab8580, 1 : 500) и Lys9 (meH3K9, тормозная модификация хроматина, антитела ab8898, 1 : 500), а также с моноклональными мышиными антителами к метилированному цитидину ДНК (meDNA, антитела sc-56615, 1 : 200) 2) инкубация с вторичными биотинилированными противокроличьими

либо противомышиными антителами (Vectastein ABC kit, Vector Laboratories, Inc., США, 1 : 200); 3) инкубация с комплексом avidina и биотинилированной пероксидазы (ABC, Vector Laboratories, Inc., США, разведение реагентов A и B 1 : 100); 4) визуализация реакции с помощью диаминобензидинового набора (DAB substrate kit for peroxidase, Vector Laboratories, Inc., США).

Анализ препаратов проводили с помощью морфометрической установки, состоящей из светового микроскопа Jenaval (Carl Zeiss, Германия), цифровой камеры Baumer CX05c (Baumer Optronic, Германия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением ВидеоТест Мастер Морфология (разработка ООО Видео Тест, Санкт-Петербург). Клетки подсчитывали в поле зрения площадью 460 × 340 мкм при увеличении объектива 40×). Определяли величину средней оптической плотности каждой клетки в усл. ед. уровня серого, обратно пропорциональных единицам яркости. Для анализа проводили иммуногистохимическую реакцию на 4-х гистологических препаратах от каждого животного, усредняя значения для каждой области мозга с одного поля зрения конкретной области мозга на срезе. Результаты обрабатывали с помощью пакетов анализа данных STATISTICA 7.0 Stat Soft, Inc и Microsoft Excel'2003, использовали непараметрический критерий Манн–Уитни (Mann–Whitney U-test). Изменения считали достоверными при $P \leq 0.05$. Все результаты представлены в виде среднего арифметического и его ошибки. Результаты выражены в процентах от контроля, принятого за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метилирование ДНК (meDNA). На рис. 1 представлены репрезентативные микрофотографии иммунопозитивных к метилированной ДНК клеток в поле CA1 гиппокампа и неокортексе (II и V слои) контрольных крыс и крыс, подвергавшихся воздействию тяжелой гипобарической гипоксии или введению дексаметазона на 14–16-е сут пренатального онтогенеза. На графиках представлены изменения содержания meDNA в клетках CA1 области гиппокампа и во II и V слоях неокортекса 14-суточных, 3-месячных и 18-месячных крыс после воздействия тяжелой гипобарической гипоксии или введения дексаметазона на 14–16-е сут пренатального онтогенеза по отношению к контролю (за 100% приняли оптическую плотность клеток, иммунопозитивных к meDNA в срезах мозга 3-месячных контрольных животных). У 18-месячных контрольных животных снижается степень метилирования ДНК в области CA1 гиппокампа и во II слое неокортекса по сравнению с 3-месячными (на 17 и 42% соответственно). Увеличение уровня метилирования ДНК при предъявлении гипобарической гип-

оксии или введении дексаметазона на 14–16-е сут пренатального онтогенеза наблюдаются во всех исследованных структурах мозга крыс вне зависимости от их возраста.

Метилирование H3 по лизину 4 (meH3K4). На рис. 2 представлены репрезентативные микрофотографии иммунопозитивных к метилированному гистону H₃ по лизина 4 клеток в поле CA1 гиппокампа и неокортексе (II и V слои) контрольных крыс и крыс, подвергавшихся воздействию тяжелой гипобарической гипоксии или введению дексаметазона на 14–16-е сут пренатального онтогенеза. На графиках представлены изменения содержания meH3K4 в клетках CA1 области гиппокампа и во II и V слоях неокортекса 14-суточных, 3-месячных и 18-месячных крыс после воздействия тяжелой гипобарической гипоксии или введения дексаметазона на 14–16-е сут пренатального онтогенеза по отношению к контролю (за 100% приняли оптическую плотность клеток, иммунопозитивных к meH3K4 в срезах мозга 3-месячных контрольных животных).

Уровень метилирования гистона H3 по лизину 4 не зависел от возраста контрольных животных. Пренатальная гипоксия, так же, как и введение дексаметазона, приводила к снижению средней оптической плотности иммунопозитивных к meH3K4 клеток в области CA1 гиппокампа 14-суточных (до 83 и 85% соответственно, по отношению к своему контролю) и 18-месячных (до 72 и 64% соответственно) крыс. У взрослых 3-месячных экспериментальных крыс количество meH3K4 не отличалось от контроля.

В неокортексе наибольшие изменения уровня meH3K4 вследствие пренатальной гипоксии наблюдалась у старых полуторогодовалых животных (снижение до 31 и 34% по сравнению с контролем в V и II слоях соответственно). Введение дексаметазона не приводило к снижению уровня meH3K4 в неокортексе крыс ювенильных и старых экспериментальных крыс. Однако, наблюдалось достоверное снижение средней оптической плотности иммунопозитивных к meH3K4 клеток в V слое неокортекса после введения дексаметазона на 14–16-е сут пренатального онтогенеза.

Метилирование H3 по лизину 9 (meH3K9). На рис. 3 представлены репрезентативные микрофотографии иммунопозитивных к метилированному гистону H₃ по лизина 9 клеток в поле CA1 гиппокампа и неокортексе (II и V слои) контрольных крыс и крыс, подвергавшихся воздействию тяжелой гипобарической гипоксии или введению дексаметазона на 14–16-е сут пренатального онтогенеза. На графиках представлены изменения содержания meH3K9 в клетках CA1 области гиппокампа и во II и V слоях неокортекса 14-суточных, 3-месячных и 18-месячных крыс после воздействия тяжелой гипобарической гипоксии или

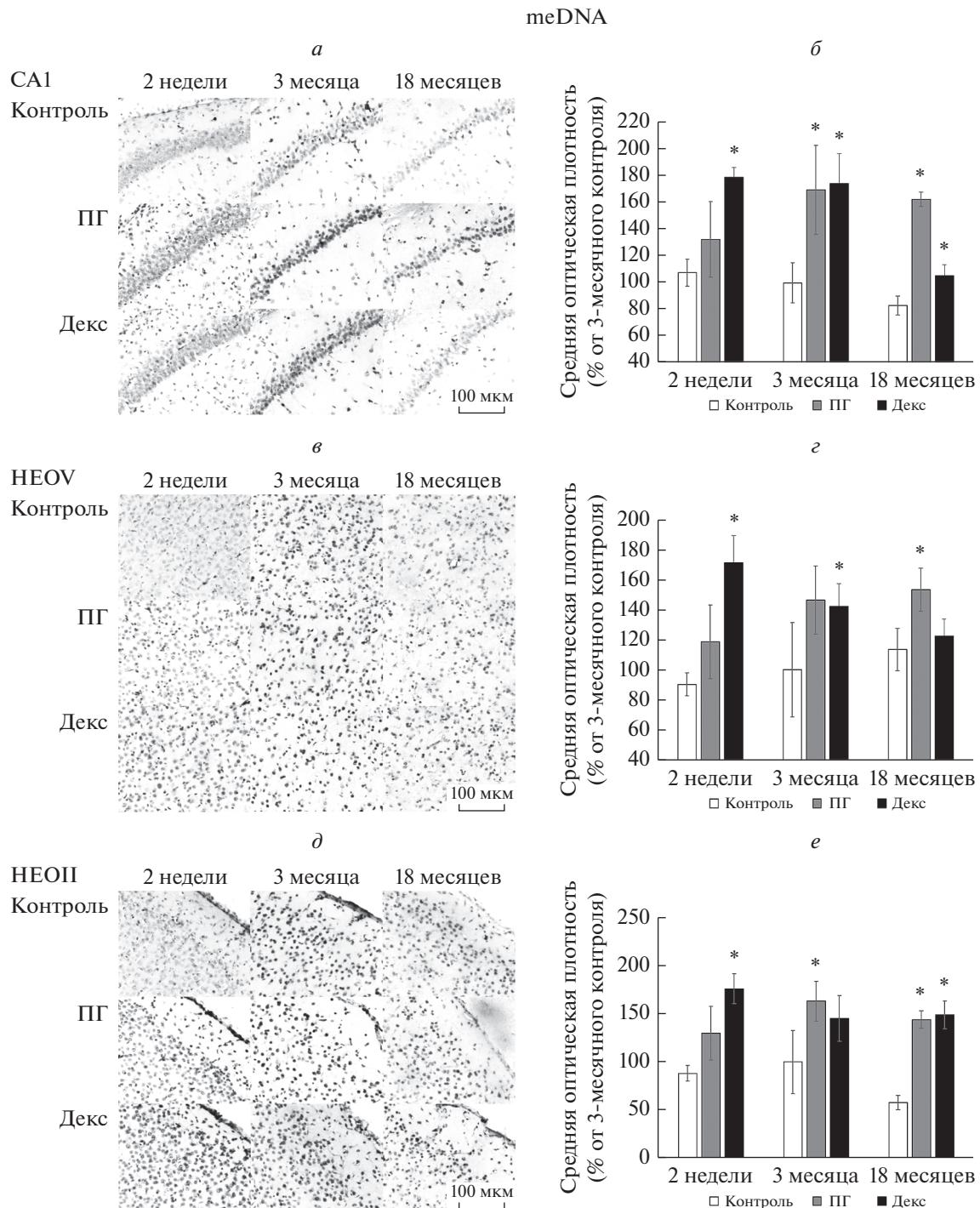


Рис. 1. Микрофотографии ($40\times$) (a, в, д) CA1 поля гиппокампа (a), 5-го слоя неокортекса (НЕОВ) (в) и 2-го слоя неокортекса (НЕОII) (д) 2-недельных, 3-месячных и 18-месячных контрольных крыс (Контроль) и крыс, переживших тяжелую гипбарическую гипоксию (ПГ) либо инъекции дексаметазона (Декс) на 14–16-е сут пренатального развития. Иммуногистохимическая реакция на метилирование ДНК (meDNA). Маркер, 100 мкм. Средняя оптическая плотность имmunопозитивных к meDNA клеток (б, г, е) CA1 поля гиппокампа (б), 5-го слоя неокортекса (НЕОВ) (г) и 2-го слоя неокортекса (НЕОII) (е) 2-недельных, 3-месячных и 18-месячных контрольных крыс (Контроль) и крыс, переживших тяжелую гипбарическую гипоксию (пренатальная гипоксия, ПГ) либо инъекции дексаметазона (Декс) на 14–16-е сут пренатального развития. По оси абсцисс – наименование экспериментальных групп; по оси ординат – средняя оптическая плотность имmunопозитивных клеток и временные точки, выраженная в % от 3-месячного контроля. * – различия с контролем статистически достоверны, $p \leq 0.05$.

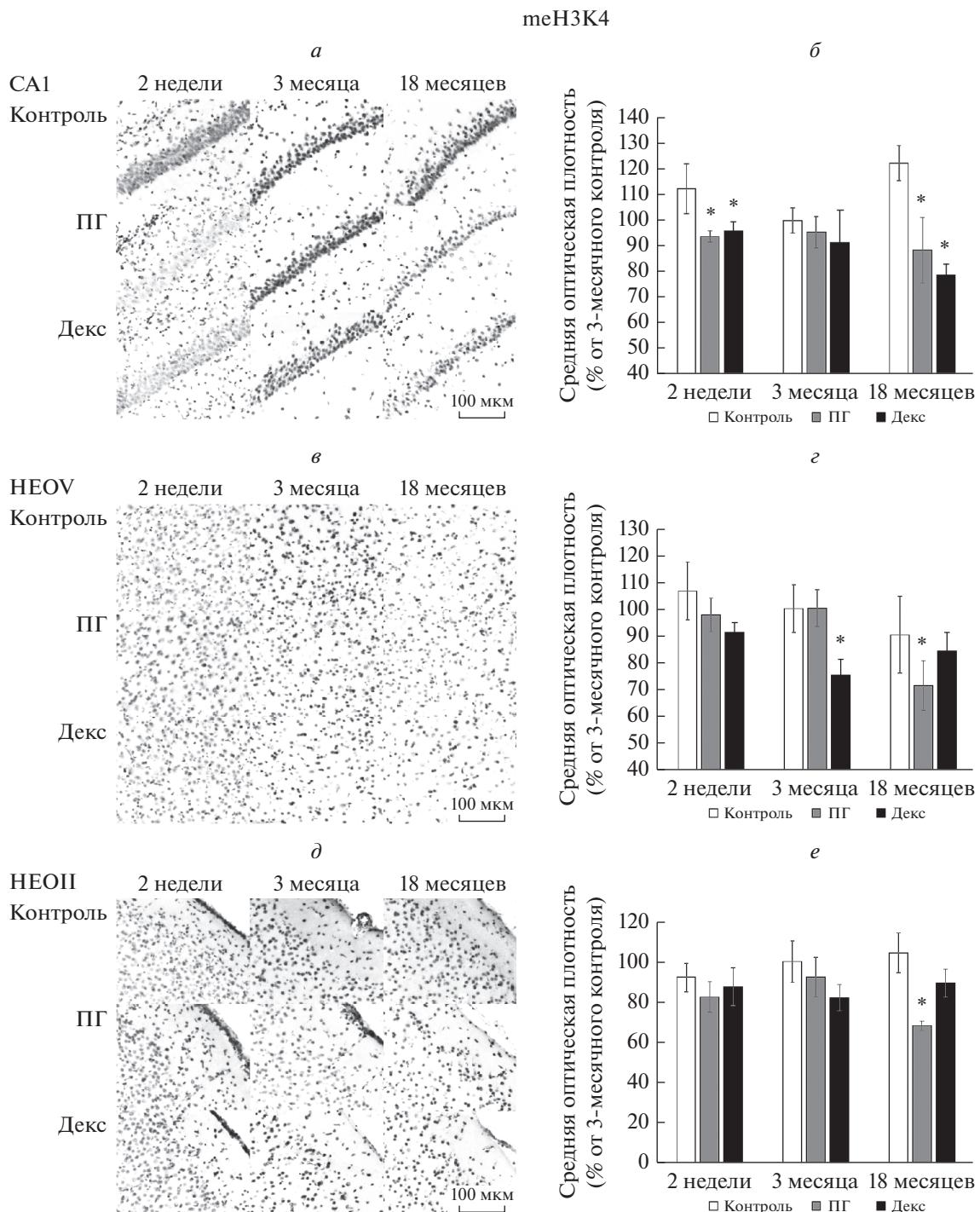


Рис. 2. Микрофотографии ($40\times$) (а, в, д) СА1 поля гиппокампа (а), 5-го слоя неокортикса (НЕОВ) (в) и 2-го слоя неокортикса (НЕОII) (д) 2-недельных, 3-месячных и 18-месячных контрольных крыс (Контроль) и крыс, переживших тяжелую гипбарическую гипоксию (пренатальная гипоксия, ПГ) либо инъекции дексаметазона (Декс) на 14–16-е сут пренатального развития. Иммуногистохимическая реакция на гистон H3, метилированный по Lys4 (mH3K4). Маркер, 100 мкм. Средняя оптическая плотность иммунопозитивных к mH3K4 клеток (б, г, е) СА1 поля гиппокампа (б), 5-го слоя неокортикса (НЕОВ) (г) и 2-го слоя неокортикса (НЕОII) (е) 2-недельных, 3-месячных и 18-месячных контрольных крыс (Контроль) и крыс, переживших тяжелую гипбарическую гипоксию (пренатальная гипоксия, ПГ) либо инъекции дексаметазона (Декс) на 14–16-е сут пренатального развития. По оси абсцисс – наименование экспериментальных групп и временные точки; по оси ординат – средняя оптическая плотность иммунопозитивных клеток, выраженная в % от 3-месячного контроля. * – различия с контролем статистически достоверны, $p \leq 0.05$.

введения дексаметазона на 14–16-е сут пренатального онтогенеза по отношению к контролю (за 100% приняли оптическую плотность клеток, иммунопозитивных к тeH3K9 в срезах мозга 3-месячных контрольных животных).

У контрольных животных обнаружено достоверное снижение средней оптической плотности иммунопозитивных к тeH3K9 клеток в области CA1 гиппокампа (до 75%) и пятом слое неокортика (до 85%) стареющих (18-месячных) крыс по сравнению с взрослыми (3-месячными).

У ювенильных 2-недельных и взрослых 3-месячных животных экспериментальной группы средняя оптическая плотность клеток, иммунопозитивных к тeH3K9, не отличалася от контроля. То есть, пренатальное воздействие гипобарической гипоксии или введение дексаметазона в большей степени затрагивает активационные сайты гистонов H3. Уровень тeH3K9 в области CA1 гиппокампа старых экспериментальных животных снижался в меньшей степени, чем у контрольных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основной целью проведенных исследований было изучения характера вовлечения эпигенетических механизмов в формирование показанных нами ранее [42, 43] нарушений функциональной активности мозга на молекулярно-клеточном и поведенческом уровнях вследствие воздействия гипоксии или введения дексаметазона в течение третьей недели пренатального онтогенеза крыс. Особое внимание в настоящей работе уделяется сопоставлению результатов, полученных на животных разных возрастных групп, включая период геронтогенеза (период старения).

В нашей работе в период постнатального онтогенеза у контрольных животных были обнаружены возрастные модификации степени метилирования ДНК и гистона H3 по лизину 9 (но не по лизину 4), а именно снижение уровня тeDNA и тeH3K9 у старых 18-месячных крыс по сравнению с 3-месячными. Возрастные изменения уровня тeDNA и тeH3K9, модификаций, способствующих торможению экспрессии генов, могут вовлекаться в обнаруженные нами нарушения способности к обучению крыс в лабиринте Морриса в процессе естественного старения [44].

Воздействие стресса в пренатальный период является примером “программирования развития мозга на ранней стадии” – явления, которое обусловлено действием стрессовых фактор в критические периоды развития, вызывающих стойкие изменения в физиологических функциях и поведении в последующей жизни [45, 46]. Пере-программирование эпигенома в течение раннего развития организма является очень сложным и

хорошо организованный процессом, включающим взаимодействие молекулярных изменений ДНК и гистоновых белков [47, 48], определяющим баланс экспрессии генов, участвующих в поддержании пластичности клеток при адаптации к изменяющимся условиям среды. Кроме того, изменение баланса метилирования/деметилирования ДНК, модификации гистонов в период эмбрионального развития играет существенную роль в регуляции дифференцировки клеток-предшественников между нейрогенезом и астроглиогенезом [49, 50].

Пренатальная гипоксия на 14–16-е сут пренатального онтогенеза приводит к увеличению уровня тeDNA во всех исследованных структурах мозга вне зависимости от возраста крыс. Введение в те же сроки беременности дексаметазона так же повышает степень метилирования ДНК, причем в наибольшей степени это проявляется у ювенильных животных. Метилирование ДНК – фундаментальный эпигенетический механизм контроля экспрессии генов у млекопитающих, связанный, в основном, с репрессией транскрипции, который заключается в присоединении метильной группы к углероду в 5-м положении молекулы цитозина с образованием 5-метилцитозина. Усиление метилирования ДНК подавляет экспрессию гипоксия-индукционного фактора HIF-1 α [51, 52], который является основным медиатором транскрипционных ответов на гипоксию, способствующим формированию гипоксии-индукируемого фенотипа [53]. В то же время показана обратная зависимость между базовым уровнем HIF-1 α в нейронах неокортика и генетически запрограммированной толерантностью организма к гипоксии [54]. Увеличение степени метилирования ДНК согласуется со снижением базовой экспрессии HIF-1 α в неокортике этих животных [44].

При анализе результатов по модификации метилирования гистона H3 по лизину 4 и 9 оказалось, что основные изменения проявляются, в основном, в отдаленные сроки после воздействия, а именно в структурах мозга 18-месячных старых крыс. При этом увеличивается уровень тeH3K4, способствующего активации транскрипции, и снижается тeH3K9, связанный, как и тeDNA, с репрессией генов.

Обнаруженное уменьшение степени метилирования гистона H3 по лизину 4 в исследованных структурах мозга старых крыс, подвергшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии на 14–16-е сут пренатального онтогенеза, согласуется с показанными нами ранее [37] модификациями ацетилирования гистона H3 по лизину 24 в гиппокампе и неокортике взрослых крыс после таких же воздействий, асH3K24 также способствует активации генов и коррелирует с показан-

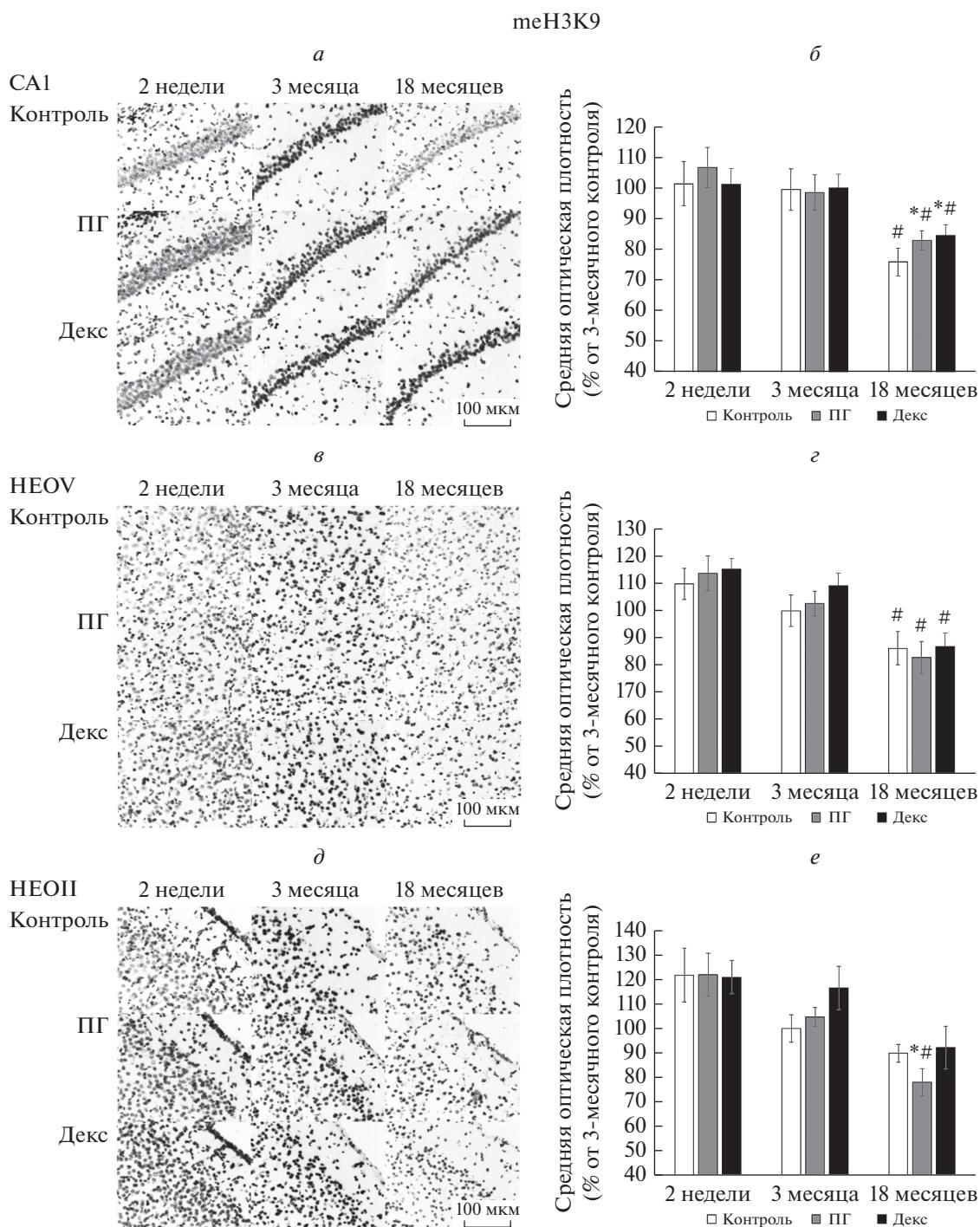


Рис. 3. Микрофотографии ($40\times$) (а, в, д) СА1 поля гиппокампа (а), 5-го слоя неокортика (HEOV) (в) и 2-го слоя неокортика (NEOII) (д) 2-недельных, 3-месячных и 18-месячных контрольных крыс (Контроль) и крыс, переживших тяжелую гипобарическую гипоксию (пренатальная гипоксия, ПГ) либо инъекции дексаметазона (Декс) на 14–16-е сут пренатального развития. Иммуногистохимическая реакция на гистон Н3, метилированный по Lys9 (meH3K9). Маркер, 100 мкм. Средняя оптическая плотность имmunопозитивных клеток (б, г, е) СА1 поля гиппокампа (б), 5-го слоя неокортика (HEOV) (г) и 2-го слоя неокортика (NEOII) (е) 2-недельных, 3-месячных и 18-месячных контрольных крыс (Контроль) и крыс, переживших тяжелую гипобарическую гипоксию (пренатальная гипоксия, ПГ) либо инъекции дексаметазона (Декс) на 14–16-е сут пренатального развития. По оси абсцисс – наименование экспериментальных групп и временные точки; по оси ординат – средняя оптическая плотность имmunопозитивных клеток, выраженная в % от 3-месячного контроля. * – различия с контролем статистически достоверны, $p \leq 0.05$. # – различия с 3-месячным контролем статистически достоверны, $p \leq 0.05$.

ными нами ранее нарушениями экспрессии глюко- и минералокортикоидных рецепторов, регулирующих экспрессию генов-мишеней, в том числе транскрипционных факторов HIF-1 α , нейрогормонов кортиколиберина и вазопрессина, антиоксидантов [55]. Отсроченные изменения степени метилирования гистона Н3 могут обуславливать усиливающиеся с возрастом нарушения функциональной активности мозга, приводящие к ослаблению памяти и способности к обучению животных, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии.

Можно предположить, что модификации генетического статуса лежат в основе ранее показанных нами длительных изменений поведения и способности к обучению, обусловленных изменениями активности основных внутриклеточных регуляторных систем (кальциевой и фосфоинозитидной), нарушений глутаматергической сигнальной трансдукции, соотношения про- и антиоксидантных систем в мозге крыс, подвергавшихся тяжелой гипобарической гипоксии в периодпренатального развития [26, 42, 43]. Профиль модификаций метилирования гистонов и ДНК, вызванныхпренатальным введением повышенных доз глюкокортикоидных гормонов (дексаметазона) отличается по степени выраженности от действияпренатальной гипоксии, что может лежать в основе неоднозначных проявлений этих воздействий на молекулярно-клеточном и поведенческом уровне, показанными нами ранее [26, 43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные могут иметь важное значение для клинической практики, способствуя раскрытию механизмов нарушений функциональной активности мозга, связанных с гипоксией и другими неблагоприятными воздействиями в раннем онтогенезе. Следует отметить, что представленные сведения о механизмах повреждения мозга после перенесенных повреждающих воздействий в периодпренатального онтогенеза создают теоретическую основу для перспективного поиска медикаментозных и немедикаментозных способов коррекции возникающих в более поздние периоды жизни неврологических и психических болезней. Кроме того, полученные данные могут иметь важное значение для клинической практики, способствуя выявлению механизмов нарушения формирования когнитивных расстройств, связанных с применением глюкокортикоидной терапии в период беременности, в частности, как предотвращение ранних родов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-01118.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. van Os J., Seltin J.P. // Br. J. Psychiatry. 1998. V. 172. P. 324–326.
2. Van den Bergh B.R., Marcoen A. // Child Dev. 2004. V. 75. № 4. P. 1085–1097.
3. Beversdorf D.Q., Manning S.E., Hillier A., Anderson S.L., Nordgren R.E., Walters S.E., Nagaraja H.N., Cooley W.C., Gaelic S.E., Bauman M.L. // J. Autism. Dev. Disord. 2005. V. 35. № 4. P. 471–478.
4. Khashan A.S., Abel K.M., McNamee R., Pedersen M.G., Webb R.T., Baker P.N., Kenny L.C., Mortensen P.B. // Arch. Gen. Psychiatry. 2008. V. 65. № 2. P. 146–52.
5. Van den Bergh B.R., Van Calster B., Smits T., Van Huffel S., Lagae L. // Neuropsychopharmacology. 2008. V. 33. № 3. P. 536–545.
6. Grizenko N., Fortier M.E., Zadorozny C., Thakur G., Schmitz N., Duval R., Joober R. // J. Can. Acad. Child Adolesc. Psychiatry. 2012. V. 21. № 1. P. 9–15.
7. Graignic-Philippe R., Dayan J., Chokron S., Jacquet A.Y., Tordjman S. // Neurosci. Biobehav. Rev. 2014. V. 43. P. 137–162.
8. de Boo H.A., Harding J.E. // Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol. 2006. V. 46. P. 4–14.
9. Warner M.J., Ozanne S.E. // Biochem. J. 2010. V. 427. P. 333–347.
10. Langley-Evans S.C., McMullen S. // Med. Princ. Pract. 2010. V. 19. P. 87–98.
11. Barker D.J., Osmond C., Kajantie E., Eriksson J.G. // Ann. Hum. Biol. 2009. V. 36. P. 445–458.
12. Harris A., Seckl J. // Horm. Behav. 2011. V. 59. P. 279–289.
13. Gluckman P.D., Hanson M.A., Cooper C., Thornburg K.L. // N. Engl. J. Med. 2008. V. 359. P. 61–73.
14. Gluckman P.D., Hanson M.A. // Science. 2004. V. 305. P. 1733–1736.
15. Gonzalez-Rodriguez P.J., Xiong F., Li Y., Zhou J., Zhang L. // Neurobiol. Dis. 2014. V. № 65. P. 172–179.
16. Li Y., Gonzalez P., Zhang L. // Prog. Neurobiol. 2012. V. 98. P. 145–165.
17. Wilcoxon J.S., Redei E.E. // Horm. Behav. 2007. V. 51. № 3. P. 321–327.
18. Salomon S., Bejar C., Schorer-Apelbaum D., Weinstock M. // J. Neuroendocrinol. 2011. V. 23. № 2. P. 118–128.
19. Reynolds R.M. // Clin. Obstet. Gynecol. 2013. V. 56. № 3. P. 602–609.
20. Crowther C.A., Doyle L.W., Haslam R.R., Hiller J.E., Harding J.E., Robinson J.S. // N. Engl. J. Med. 2007. V. 357. P. 1179–1189.
21. French N. P., Hagan R., Evans S. F., Mullan A., Newnham J.P. // Am. J. Obstet. Gynecol. 2004. V. 190. P. 588–595.
22. Braun T., Challis J.R., Newnham J.P., Sloboda D.M. // Endocr. Rev. 2013. V. 34. P. 885–916.
23. Moors M., Bose R., Johansson-Haque K., Edoff K., Okret S., Ceccatelli S. // Toxicol. Sci. 2012. V. 125. P. 488–495.
24. Sorrells S.F., Munhoz C.D., Manley N.C., Yen S., Sapolsky R.M. // Neuroendocrinology. 2014. V. 100. № 2. P. 129–140.

25. Stutchfield P.R., Whitaker R., Gliddon A.E., Hobson L., Kotecha S., Doull I.J. // Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed. 2013. V. 98. № 3. P. 195–200.
26. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Алёхин А.Н., Стратилов В.А. // Журн. эволюционной физиологии и биохимии. Т. 54. № 6. 2018. С. 404–410.
27. Bhutani N., Burns D.M., Blau H.M. // Cell. 2011. V. 146. P. 866–872.
28. Suganuma T., Workman J.L. // Annu. Rev. Biochem. 2011. P. 80. P. 473–499.
29. Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P.A. // Nature. 2004. V. 429. P. 457–463.
30. Chen M., Zhang L. // Drug. Discov. Today. 2011. V. 16. P. 1007–1018.
31. Concepcion K.R., Zhang L. // Drug. Discov. Today. 2018. V. 23. № 10. P. 1718–1732.
32. Oakley R., Busada T., Cidlowski J. // FASEB J. 2018. V. 32. № 10.
33. Jobe E.M., Zhao X. // Brain. Plasticity. 2017. V. 3. № 1. P. 5–26.
34. Freitag M., Selker E.U. // Curr. Opin. Genet. Dev. 2005. V. 15. P. 191–199.
35. Weber M., Hellmann I., Stadler M.B., Ramos L., Pääbo S., Rebhan M., Schübeler D. // Nat. Genet. 2007. V. 39. P. 457–466.
36. Perez-Perri J.I., Acevedo J.M., Wappner P. // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. P. 4705–4721.
37. Тюлькова Е.И., Ветровой О.В., Сарцева К.В., Ватаева Л.А., Глушенко Т.С. // Нейрохимия. 2017. Т. 34. № 4. С. 310–316.
38. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Ветровой О.В., Сарцева К.В., Стратилов В.А. // Цитология. 2019. Т. 61. № 2. С. 98–105.
39. Стroeв С.А., Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О., Пельто-Хуикко М.Т. // Нейрохимия. 2011. Т. 28. С. 226–231.
40. Slotkin T.A., Kreider M.L., Tate C.A., Seidler F.J. // Neuropsychopharmacology. 2006. 31. № 5. P. 904–911.
41. Vilaca Junior P.E.A., Teixeira A.A.C., Wanderley-Teixeira V., Moraes E.F., Araujo A.C.C., Maia C.S. // Int. J. Morphol. 2008. V. 26. № 3. P. 523–527.
42. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О., Отмелин В.А. // Журн. акушерства и женских болезней. 2010. Т. 59(4). С. 99–110.
43. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Ветровой О.В., Романовский Д.Ю. // Журн. эволюц. биохим. и физиол. им. И.М. Сеченова. 2015. Т. 51. № 2. С. 115–121.
44. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Ветровой О.В. // Детская медицина Северо-Запада. 2018. Т. 7. № 1. С. 319–320.
45. Barker D.J. // Mol. Med. Today. 1995. V. 1. № 9. P. 418–423.
46. Nyirenda M.J., Seckl J.R. // Int. J. Mol. Med. 1998. V. 2 № 5. P. 607–614.
47. Dasgupta C., Chen M., Zhang H., Yang S., Zhang L. // Hypertension. 2012. V. 60. P. 697–704.
48. Liu X., Wang C., Liu W., Li J., Li C., Kou X., Chen J., Zhao Y., Gao H., Wang H., Zhang Y., Gao Y., Gao S. // Nature. 2016. V. 537. P. 558–562.
49. Sauvageot C.M., Stiles C.D. // Curr. Opin. Neurobiol. 2002. V. 12. P. 244–249.
50. Takizawa T., Nakashima K., Namihira M., Ochiai W., Uemura A., Yanagisawa M., Fujita N., Nakao M., Taga T. // Dev. Cell. 2001. V. 1. P. 749–758.
51. Koslowski M., Luxemburger U., Tureci O., Sahin U. // Oncogene. 2011. V. 30. P. 876–882.
52. Walczak-Drzewiecka A., Ratajewski M., Pulaski L., Dastych J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. V. 391. P. 1028–1032.
53. Watson J.A., Watson C.J., McCann A., Baugh J. // Epigenetics. 2010. V. 5. № 1. P. 293–296.
54. Кирова Ю.И. // Патол. физиология и эксперим. терапия. 2012. Т. 56. № 3. С. 51–55.
55. Kodama T., Shimizu N., Yoshikawa N., Makino Y., Ouchida R., Okamoto K., Hisada T., Nakamura H., Morimoto C., Tanaka H. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 35. P. 33384–33391.

Peculiarities of DNA and Histone H3 Methylation in the Hippocampus and Neocortex of Rats Subjected to Pathological Treatments during the Prenatal Period

E. I. Tyul'kova^a, L. A. Vataeva^b, V. A. Stratilov^a, V. S. Barysheva^a, and O. V. Vetrovoy^{a,c}

^aPavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^bHerzen Russian State Pedagogical University, St. Petersburg, Russia

^cDepartment of Biochemistry, Faculty of Biology, St. Petersburg, Russia

Stress during pregnancy may be the cause of structural and functional changes in the fetal brain, which subsequently lead to the formation of various neuropsychic diseases, including attention deficit hyperactivity disorder, depression, schizophrenia, autism, and others. Among stress factors that can lead to disorders of fetal development, a special place is occupied by prenatal hypoxic stress. Epigenetic mechanisms may play a key role in the development of disorders of the functional activity of the brain, which are caused by stressful effects of various nature. The aim of this work was to study the age-related characteristics of DNA methylation (meDNA) and histone H3 at lysines 4 (meH3K4) and 9 (meH3K9) in the cells of the rat hippocampus and neocortex, the most sensitive to hypoxia brain structures, after severe hypobaric hypoxia (180 mmHg, 3 h) or the administration of a synthetic glucocorticoid dexamethasone (0.8 mg/kg), which models the stress response of the mother's body, on the 14–16th day of prenatal ontogeny. Using the immunohistochemical method, we detected age-related modifications of the intensity of meDNA and meH3K9 (but not meH3K4)

in control animals, namely, a decrease in the level of meDNA and meH3K9 in 18-month-old rats compared to 3-month-old ones. The severe hypobaric hypoxia, as well as the administration of dexamethasone, on the 14–16th day of prenatal ontogeny led to a prolonged (up to 18 months) increase in the level of meDNA in all the studied brain structures. In this case, we observed a decrease in the level of meH3K4, an activating modification of chromatin, in the hippocampus and neocortex of rats, which was progressing with age. However, the level of meH3K9, an inhibitory modification of chromatin, in animals that were subjected to adverse treatments during the prenatal period decreased to a lesser extent with age than in the control rats. These data indirectly reflect a decrease in the transcriptional activity of the genome of prenatally stressed animals, which may underlie long-term changes in their learning abilities.

Keywords: prenatal hypoxia, prenatal administration of dexamethasone, brain, DNA methylation, histone H3 methylation