

Ю.И. Кирова, Э.Л. Германова, Л.Д. Лукьянова

Фенотипические особенности экспрессии фактора, индуцированного гипоксией, и редокс-статус клеток неокортекса крыс на разных стадиях адаптации к гипоксии

Гипоксические воздействия в режиме прекондиционирования вызывают в коре головного мозга неустойчивых к гипоксии крыс фазное увеличение экспрессии фактора, индуцированного гипоксией (HIF-1 α). Показано, что после каждого гипоксического воздействия наблюдается кратковременная фаза срочной экспрессии HIF-1 α , которая быстро нивелируется в нормоксических условиях. Вторичное увеличение экспрессии развивается через сутки после очередного гипоксического воздействия. Фазность срочной и долгосрочной экспрессии HIF-1 α коррелирует с динамикой формирования у неустойчивых к гипоксии крыс срочной и отсроченной резистентности, что позволяет предполагать вовлеченность HIF-1 в механизмы не только долговременной, но и срочной адаптации к гипоксии. Показано, что воздействия гипоксии в режиме прекондиционирования мобилизуют антиоксидантную систему (индуцируют активацию Cu,Zn-супероксиддисмутазы), не влияют на интенсивность процессов ПОЛ в неокортексе (интервальная нормобарическая гипоксия, 10 % O₂) или снижают в раннем постгипоксическом периоде содержание продуктов липопероксидации и окисленного глутатиона в клетках неокортекса (гипобарическая гипоксия – ГБГ-5000, 10,6 % O₂). В условиях отсутствия активизации процессов свободнорадикального и перекисного окисления прекондиционирующие режимы гипоксии увеличивают экспрессию HIF-1 α в неокортексе неустойчивых к гипоксии крыс, индуцируют формирование срочной и долговременной адаптации к гипоксии. Таким образом, активные формы кислорода не имеют определяющего значения в индукции экспрессии HIF-1 α и формировании срочной и долговременной адаптации к гипоксии. У высокоустойчивых животных гипоксические воздействия в режиме прекондиционирования не влияют на экспрессию HIF-1 α и формирование адаптации. Воздействия тяжелой гипоксии (ГБГ-7000, 8 % O₂) вызывают активизацию процессов ПОЛ в неокортексе неустойчивых к гипоксии крыс. В условиях доминирования прооксидантных систем над антиоксидантными наблюдается снижение экспрессии HIF-1 α в неокортексе, нарушение формирования срочной и долговременной адаптации к гипоксии.

Ключевые слова: HIF-1 α , неокортекс, гипоксическое прекондиционирование, тяжелая гипоксия, высокоустойчивые и неустойчивые к гипоксии крысы, срочная и долговременная адаптация к гипоксии, перекисное окисление липидов, гидроперекиси липидов, конъюгированные диены, окисленный глутатион, продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, особая роль в формировании адаптации к гипоксии принадлежит специфическому гипоксическому транскрипционному фактору HIF-1 (от англ. Hypoxia Inducible Factor), координирующему генно-опосредованные ме-

ханизмы этого процесса как на клеточном, так и на системном уровнях. HIF-1 экспрессируется в самых разных типах клеток, функционирует как транскрипционный активатор и ключевой регулятор кислородного гомеостаза у всех ядерных метазоа и является эволюционным продуктом адаптации к изменению содержания кислорода в окружающей среде [12, 27, 32].

© Ю.И. Кирова, Э.Л. Германова, Л.Д. Лукьянова

HIF-1 – это гетеродимерный редоксчувствительный белок, который состоит из конститутивно экспрессируемой субъединицы HIF-1 β и O₂-регулируемой субъединицы HIF-1 α [42]. Синтез HIF-1 α индуцируют разные группы сигнальных молекул, включая сукцинат, факторы роста, цитокины, гормоны, вазоактивные пептиды, с помощью активации PI3K- или MAPK-опосредованных сигнальных путей [31]. Этот процесс кислороднезависим. Протеасомная деградация HIF-1 α инициируется пролилгидроксилазами (от англ. Prolyl Hydroxylase-Domaine containing protein – PHD; HIF-1 Prolyl Hydroxylase - PHH), которые используют O₂ и α -кетоглутарат в качестве субстратов, необходимых для катализа диоксигеназной реакции. При этом один атом O₂ включается в остаток пролина, а второй – в α -кетоглутарат с образованием сукцината и CO₂ [22]. В условиях гипоксии активность PHDs снижается, HIF-1 α аккумулируется в клетке, реализуется его транскрипционная функция, связанная с экспрессией генов адаптации.

В настоящее время обширная литература посвящена регуляции активности HIF-1, в том числе его взаимодействию с другими сигнальными путями, на разных стадиях адаптации к гипоксии. Так, например, широко обсуждается гипотеза триггерной роли активных форм кислорода (АФК) преимущественно митохондриального происхождения в стабилизации, активации и экспрессии HIF-1 при гипоксическом сигналинге. Эта гипотеза сформировалась на основе многочисленных фактов, подтверждающих гипоксическую гиперпродукцию АФК в митохондриях [8, 10, 37], потенцирующее их действие на PI3K- и MAPK-сигнальные пути [17, 36], ингибирование кислородными метаболитами HIF-специфичных пролилгидроксилаз, что приводит к стабилизации и аккумуляции последнего [10].

При обсуждении сигнальной роли АФК в гипоксических условиях следует учитывать, что способность HIF-1 связывать транс-

крипционные ко-активаторы и HRE (от англ. hypoxia-responsible element) генов-мишеней, является редоксчувствительной и регулируется соотношением GSSG/GSH [18]. Высокий уровень GSSG – маркера окислительного стресса – препятствует стабилизации HIF-1 α в условиях гипоксии, его транслокации в ядро, ДНК-связыванию и взаимодействию с ко-активаторами транскрипции [19, 20]. При активации свободнорадикальных процессов, которая наблюдается при тяжелой гипоксии, возможна также окислительная модификация HIF-1 α АФК по остаткам цистеина [41] и последующая деградация окисленного HIF-1 α в убиквитиннезависимом 20S протеасомном пути [34].

В последние годы появились работы, в которых доказывается, что снижение содержания молекулярного кислорода в окружающей среде приводит к уменьшению продукции в клетках АФК [5]. Так, например, показано, что в изолированном перфузируемом легком во время гипоксии уменьшается продукция супероксидного радикала (O₂^{•-}) [30]. В культурах клеток, инкубируемых в условиях гипоксии (0,01 – 4 % O₂), было обнаружено значимое снижение активности пентозофосфатного цикла, что указывает на уменьшение митохондриальной и цитозольной продукции АФК. Обратный эффект наблюдался при гипероксии, которая вызывала увеличение активности пентозофосфатного цикла [38]. Таким образом, метаболическая продукция АФК является, по-видимому, прямой функцией pO₂, как было предсказано Boveris и Chance [11].

Существует и альтернативная свободнорадикальной гипотезе точка зрения, согласно которой аккумуляция HIF-1 α при гипоксии связана с репрограммированием работы дыхательной цепи и увеличением образования эндогенного сукцината – ингибитора реакций протеасомной деградации HIF-1 α и активатора его кислороднезависимого синтеза, контролируемого сигнальными системами MAPK и PI3K [2, 6]. Содержание сукцината

– метаболита цикла трикарбоновых кислот – многократно увеличивается в тканях и крови при гипоксии, что позволяет считать его молекулярным маркером гипоксических/ишемических состояний, сигнальная функция которого опосредуется высокоспецифичным рецептором GPR91 [4, 24–26, 40]. Сукцинат ингибирует PHDs, способствуя тем самым аккумуляции HIF-1 α в клетке [33]. В настоящее время сукцинат рассматривается как сигнальная молекула, благодаря которой осуществляется сигнальная функция митохондрий, контролирующая формирование молекулярных механизмов адаптации к гипоксии [2, 6].

Резюмируя все сказанное выше, очевидно, что регуляция активности HIF-1 α при гипоксии – процесс многофакторный и очень сложный. На сегодняшний день остаются нерешенными следующие принципиальные вопросы: 1) участвует ли HIF-1 α в индукции срочных механизмов адаптации при разных режимах гипоксического воздействия; 2) влияют ли фено- и генотипические особенности организма на участие HIF-1 α в формировании срочной и долгосрочной адаптации; 3) существует ли корреляция между экспрессией HIF-1 α в тканях, активностью АФК и формированием резистентности организма к гипоксии. Именно этим вопросам посвящена данная работа.

МЕТОДИКА

Работа проведена на двух фенотипах животных: с низкой (НУ) и высокой устойчивостью (ВУ) к гипоксии белых беспородных крысах-самцах, содержащихся в виварии в стандартных условиях [7].

В течение 15 сут животных подвергали воздействию: а) интервальной нормобарической гипоксии (ИНГ) в режиме прекондиционирования (ежедневные часовые циклы, состоящие из чередования кратковременных 5-минутных периодов дыхания при постоянном нормальном давлении гипоксической

газовой смесью, содержащей 10 % O₂, сменяющихся дыханием в течение 3 мин атмосферным воздухом); суммарная длительность гипоксического воздействия в этом случае составляла 35 мин; б) гипобарической гипоксии в режиме прекондиционирования – ГБГ-5000 (подъем в барокамере на высоту 5000 м, 10,5 % O₂ и пребывание в этих условиях в течение часа); в) тяжелой гипобарической гипоксии – ГБГ-7000 (подъем в барокамере на высоту 7000 м, 8 % O₂ и пребывание в этих условиях в течение часа).

Содержание HIF-1 α определяли в наиболее чувствительной к гипоксии ткани – коре головного мозга. Забор ткани проводили сразу (1 мин) и через 24 ч после 1-, 3-, 8- и 15-го применения гипоксических воздействий в выбранном режиме. В эти же периоды оценивали степень адаптированности крыс по изменению их общей резистентности к гипоксии (время жизни в условиях острой гипобарической гипоксии на критической высоте).

Для определения содержания HIF-1 α [13] получали ядерный экстракт коры головного мозга. Белки разделяли в 8%-м полиакриламидном геле. Перенос белков с последнего на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли электроэлюцией в течение 60 мин. Преинкубацию мембраны проводили 60 мин в PBS, содержащем 0,1% Tween-20 и 5%-е обезжиренное молоко. Затем мембрану инкубировали 14 ч при 4⁰С в растворе первых поликлональных антител («Santa Cruz Biotechnology», CA, США) против HIF-1 α в разведении 1:1000. После отмывки мембрану инкубировали 60 мин в растворе вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена («Santa Cruz Biotechnology», CA, США) в разведении 1:5000. Детектирование HIF-1 α осуществляли в реакции с ECL-реагентами на пленку фирмы «Kodak» с последующей денситометрией (Adobe Photoshop CS5 Extended software version 12.0.3; Adobe Systems, San Jose, CA, США).

Для оценки редокс-статуса клеток неокортекса определяли содержание компонентов

пула глутатиона (G, GSH, GSSG) [16], продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): гидроперекисей липидов [21], диеновых конъюгатов полиненасыщенных жирных кислот [15], а также метаболитов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-ПП) [28]. В клетках неокортекса определяли активность ключевых антиоксидантных ферментов цитоплазмы: глутатионпероксидазы [29], глутатионредуктазы [14], и Cu,Zn-содержащей супероксиддисмутазы [39]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия между группами при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности действия разных режимов гипоксических воздействий на содержание HIF-1 α в неокортексе крыс с ВУ и НУ и резистентность организма.

Период полураспада HIF-1 α при обычном содержании кислорода во вдыхаемом воздухе (21 %) составляет несколько минут и, благодаря постоянно протекающему в цитозоле процессу его протеасомной деградации, внутриклеточное содержание HIF-1 α в нормоксических условиях достаточно низкое. Тем не менее, HIF-1 α постоянно синтезируется в нормоксических условиях, что видимо, необходимо для перманентной базовой индукции генов, связанных с поддержанием функциональной активности клетки и, прежде всего, с синтезом энергии. Оказалось, однако, что в нормоксических условиях базовое содержание HIF-1 α в коре головного мозга крыс с разной устойчивостью к гипоксии значительно различается. В неокортексе крыс с НУ содержание HIF-1 α было в 1,7 раза выше, чем у ВУ

(табл. 1). Таким образом, между содержанием HIF-1 α в неокортексе и резистентностью к гипоксии существует обратная зависимость. Одной из причин наблюдаемых различий может быть неодинаковая интенсивность кислородзависимой протеасомной деградации HIF-1 α в неокортексе животных с ВУ и НУ в условиях нормоксии, обусловленная более высоким уровнем оксигенации коры головного мозга у первых. Это, в свою очередь, может определять и большую эффективность у них процесса деградации гипоксического фактора. Таким образом, существуют не только тканеспецифические [1, 35], но и выраженные фенотипические различия в базовом содержании HIF-1 α в тканях, зависящие от исходной резистентности животных к гипоксии.

Влияние однократного гипоксического preconditionирования на содержание HIF-1 α в неокортексе крыс и резистентность организма. Одноразовое применение ИНГ (10 % O₂) и ГБГ-5000 м (10,5 % O₂) индуцировало в неокортексе крыс с НУ двухфазное увеличение содержания HIF-1 α (рис. 1,а). Первичное увеличение (120–140 %) наблюдалось сразу после гипоксического воздействия. Оно было кратковременным и в условиях постгипоксической реоксигенации быстро (в течение часа) нормализовалось. Второй более продолжительный период увеличения экспрессии HIF-1 α (120–130 %) развивался через 24 ч после гипоксического воздействия в условиях нормальной оксигенации, т.е. был кислороднезависим. Это позволяет предполагать, что он вызван активацией кислороднезависимого синтеза HIF-1 α и/или шаперонопомощью его стабилизацией [23].

Двухфазное увеличение экспрессии HIF-1 α коррелировало с динамикой формирования у крыс с НУ срочной и отсроченной

Таблица 1. Базовое нормоксическое содержание HIF-1 α в неокортексе крыс с индивидуальными различиями в устойчивости к острой гипоксии (в % к содержанию HIF-1 α у наиболее резистентных животных)

Время жизни (11500 м), мин, сек	0'40''	1'20''	2'20''	4'20''	8'40''
HIF-1 α , %	173*	174*	158*	116	100

* $P < 0,05$.

резистентности к гипоксии. Ранее нами было показано, что однократное гипоксическое воздействие в режиме прекондиционирования вызывает у крыс с НУ краткосрочное многократное увеличение толерантности к острой гипоксии (в 3–9 раз; см. рис. 1,б). Вторичное, отсроченное увеличение толерантности было существенно меньше (в 1,5–2 раза) и развивалось после периода ее относительной нормализации [3, 7].

У крыс с ВУ, в отличие от животных с НУ, однократное часовое воздействие гипоксии в режиме прекондиционирования не приводило ни к срочной экспрессии HIF-1 α в коре головного мозга в первые сутки постгипоксического периода, ни к увеличению его отсроченного синтеза (см. рис. 1,а). У

этого фенотипа животных была также снижена способность к формированию срочной резистентности (в 2–3 раза), а отсроченная не развивалась (см. рис. 1,б) [3, 7].

Таким образом, при гипоксических воздействиях в режиме прекондиционирования срочная экспрессия HIF-1 α , связанная как с кислородзависимым процессом его стабилизации за счет ингибирования пролилгидроксилазных реакций, так и с кислороднезависимым синтезом, реализуется только у крыс с НУ и отсутствует у животных с ВУ. Это говорит о фенотипических различиях путей образования HIF-1 α , влияющих на его участие в механизмах срочной адаптации и на формирование резистентности.

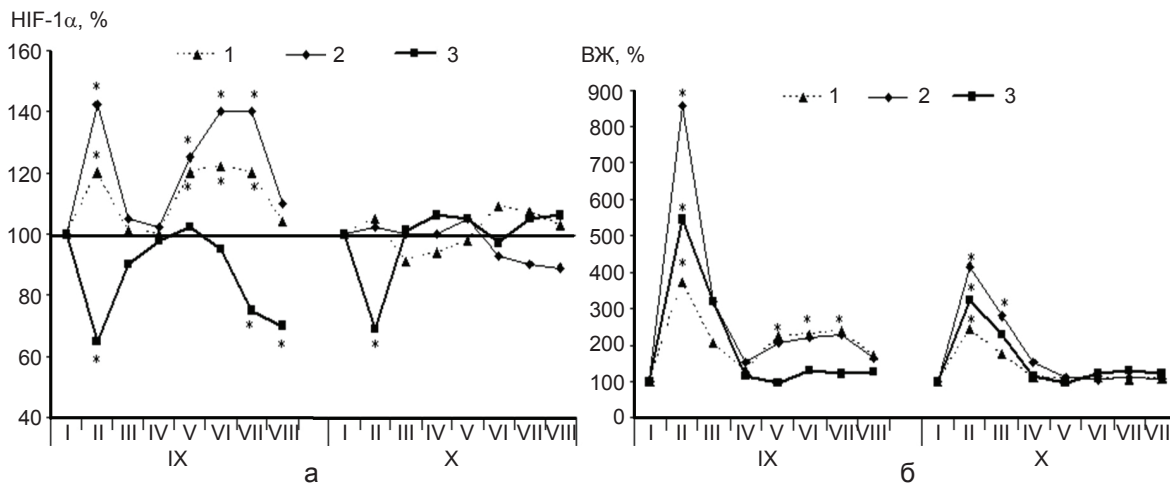


Рис. 1. Фенотипические различия в экспрессии HIF-1 α (неокортексе) и резистентности крыс к гипоксии на разных этапах формирования адаптации

1 – интервальная нормобарическая гипоксия в режиме прекондиционирования; 2 – гипобарическая гипоксия в режиме прекондиционирования; 3 – тяжелая гипобарическая гипоксия; I – контроль; II – 1 мин; III – 30 мин; IV – 2 ч; V – 24 ч; VI – 3+24 ч; VII – 8+24 ч; VIII – 15+24 ч

1 мин, 30 мин, 2 ч, 24 ч – продолжительность реоксигенации (минуты, часы)

1, 3, 8, 15 – количество гипоксических воздействий

24 ч – время после гипоксических воздействий

IX – неустойчивые к острой гипобарической гипоксии крысы; сохраняют жизнеспособность в этих условиях не более 2 мин;

X – высокоустойчивые к острой гипобарической гипоксии крысы; сохраняют жизнеспособность в этих условиях более 6 мин;

*P<0,05 достоверное различие с контрольной группой

ВЖ – «время жизни»; продолжительность пребывания животного на критической высоте (11,5 тыс. м) до появления патологических типов дыхания

Влияние однократного воздействия тяжелой гипоксии на содержание HIF-1 α и резистентность организма. Одноразовое применение ГБГ-7000 (8 % O₂) приводило у обоих фенотипов животных не к увеличению, а первичному достоверному снижению содержания HIF-1 α в коре головного мозга в ранний постгипоксический период (первые 30 мин), которое могло достигать 30–40 % (см. рис. 1,а). В последующие часы происходила его постепенная нормализация вплоть до полного восстановления исходного уровня через сутки. Снижение экспрессии HIF-1 α в условиях тяжелой гипоксии наблюдали и другие исследователи [35]. Объяснение этому явлению в настоящее время отсутствует, хотя имеются предположения, что оно может быть связано с нарастающим в этих условиях энергодиффицитом и подавлением синтеза HIF-1 α на этапе трансляции [9]. Полученные факты указывают так же на то, что регуляторная функция HIF-1 α в условиях *in vivo* реализуется лишь в определенном диапазоне концентраций кислорода во вдыхаемом воздухе и не проявляется при снижении до значений менее 10 %.

Несмотря на то, что у обоих фенотипов крыс после однократного применения тяжелой гипоксии наблюдалось подавление срочной экспрессии HIF-1 α , способность формировать срочную резистентность к острой гипоксии у них сохранялась, хотя степень ее выраженности уменьшалась сравнительно с гипоксическим прекодиционированием (ГБГ-5000; см. рис. 1,б). В отличие от этого формирование отсроченной резистентности к острой гипоксии в этих условиях вообще не происходило [3, 7].

Все это говорит о том, что формирование отсроченных механизмов адаптации полностью зависит от способности организма к экспрессии HIF-1 α , в то время как на стадии индукции адаптации HIF-1 α не является единственным сигнальным механизмом этого процесса.

Действие многократного (курсового) применения гипоксии на динамику содержания

HIF-1 α в неокортексе крыс и резистентность организма. При курсовом ежедневном применении ИНГ (10 % O₂) и ГБГ-5000 (10,5 % O₂) в режиме прекодиционирования в неокортексе крыс с НУ происходило увеличение базового содержания HIF-1 α , которое могло отражать активацию его синтеза и достигало максимальных значений в период 3–8-го гипоксических воздействий (120 %_{ИНГ}; 140 %_{ГБГ-5000}; см. рис. 1,а). После 15-го гипоксического воздействия содержание HIF-1 α , снижалось до исходных значений, что отражало, по-видимому, завершение формирования адаптации.

Динамика содержания HIF-1 α в КГМ животных с НУ коррелировала с динамикой формирования отсроченной резистентности (см. рис. 1). При увеличении числа гипоксических воздействий до 8 резистентность постепенно нарастала и превышала исходную в 2–2,5 раза. Однако после 15-го воздействия она снижалась, хотя и была выше контрольного уровня в 1,5–2,0 раза (см. рис. 1,б).

В отличие от курсового прекодиционирования, многократное применение тяжелой гипоксии (ГБГ-7000, 8 % O₂) вызывало у крыс с НУ снижение базового содержания HIF-1 α в неокортексе, которое нарастало по мере увеличения числа гипоксических воздействий (до 30 % после 15-го воздействия; см. рис. 1,а). Устойчивое снижение экспрессии HIF-1 α в этих условиях можно рассматривать как формирование дезадаптивных процессов.

У крыс с ВУ, в отличие от животных с НУ, ни курсовое гипоксическое воздействие в режиме прекодиционирования, ни многократное применение тяжелой гипоксии не влияли на содержание HIF-1 α и не индуцировали формирование отсроченной резистентности к острой гипоксии (см. рис. 1).

Таким образом, только у фенотипа крыс с НУ в условиях гипоксического прекодиционирования была установлена положительная динамика экспрессии HIF-1 α , которая коррелировала с увеличением резистентности к острой гипоксии. Тяжелая гипоксия

индуцировала у них отрицательную динамику экспрессии HIF-1 α , снижение срочной резистентности и нарушение формирования долговременной адаптации к гипоксии.

Влияние разных режимов гипоксических воздействий на редокс-статус и экспрессию HIF-1 α в неокортексе крыс с НУ.

Однократное воздействие разных режимов гипоксии (ИНГ-10 % O₂, ГБГ-5000 – 10,5 % O₂, ГБГ-7000 – 8 % O₂) вызывало разнонаправленные срочные изменения параметров редокс-статуса клеток неокортекса у крыс с НУ. Воздействие ИНГ не влияло на содержание продуктов липидной перекисидации и компонентов системы глутатиона, но индуцировало кратковременное увеличение активности Cu,Zn-СОД (рис. 2). Таким образом, ИНГ не влияла на редокс-статус клеток и оказывала лишь срочное кратковременное потенцирующее действие на антиоксидантную систему.

В отличие от ИНГ, часовое воздействие ГБГ-5000 вызывало в раннем постгипоксическом периоде снижение содержания гидроперекисных метаболитов и GSSG в клетках неокортекса, а также кратковременную активацию Cu,Zn-СОД, более выраженную сравнительно с ИНГ (см. рис. 2). Вторичное увеличение активности СОД происходило через 24 ч реоксигенации. Следовательно, в отличие от ИНГ, воздействие ГБГ-5000 сопровождалось снижением интенсивности процессов свободнорадикального и перекисного окисления в неокортексе, и этот процесс являлся суммарным итогом снижения скорости АФК-генерации и активизации антиоксидантной системы.

Таким образом, при однократных гипоксических воздействиях в режиме прекондиционирования увеличение срочной экспрессии HIF-1 α происходит при отсутствии изменений редокс-статуса клеток неокортекса (ИНГ)

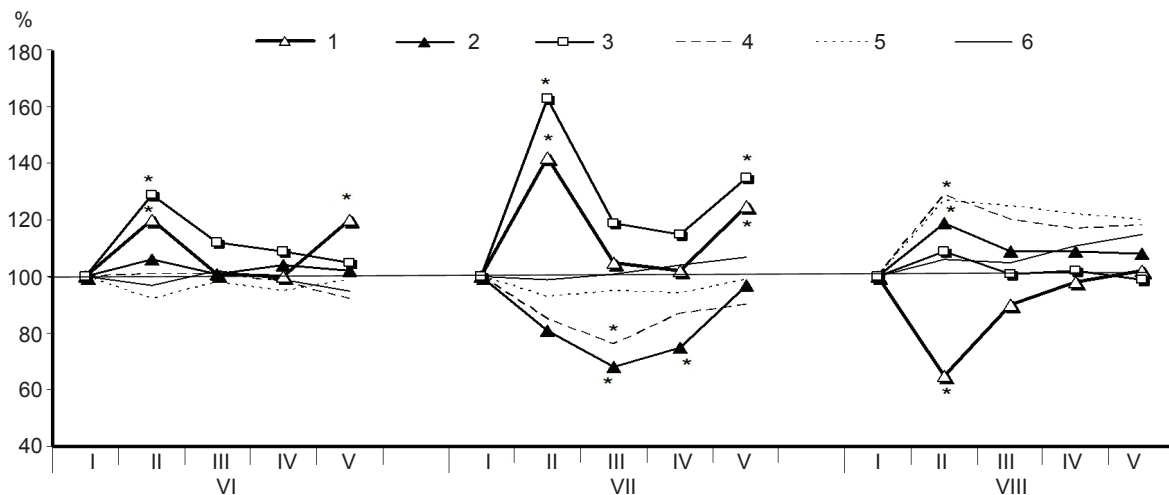


Рис. 2. Влияние однократного воздействия разных режимов гипоксии на содержание продуктов липидной перекисидации, окисленного глутатиона, активность Cu,Zn-супероксиддисмутазы и экспрессию HIF 1 α в неокортексе крыс, неустойчивых к гипоксии

1 – HIF-1 α , 2 – окисленный глутатион, 3 – Cu,Zn-супероксиддисмутазы, 4 – гидроперекиси липидов, 5 – диеновые конъюгаты, 6 – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой;

I – контроль; II – 1 мин; III – 30 мин; IV – 2 ч; V – 24 ч

1 мин, 30 мин, 2 ч, 24 ч – продолжительность реоксигенации (минуты, часы)

VI – интервальная нормобарическая гипоксия в режиме прекондиционирования; VII – гипобарическая гипоксия в режиме прекондиционирования; VIII – тяжелая гипобарическая гипоксия.

*P<0,05 достоверное различие с контрольной группой

или даже на фоне снижения интенсивности процессов свободнорадикального окисления (ГБГ-5000). Полученные результаты позволяют предполагать, что АФК не участвуют в регуляции срочной экспрессии HIF-1 α .

При однократном воздействии тяжелой формы гипоксии (ГБГ-7000) в клетках неокортекса происходило кратковременное снижение экспрессии HIF-1 α на фоне увеличения содержания гидроперекисных метаболитов, диеновых конъюгатов и GSSG в ранний постгипоксический период с последующей быстрой (через 2 ч) его нормализацией (см. рис. 2). Восстановление базового уровня экспрессии HIF-1 α в постгипоксическом периоде может свидетельствовать о транзитном характере нарушений синтеза HIF-1 α , индуцированных тяжелой гипоксией [9]. Тем не менее, активность Cu,Zn-СОД и глутатионзависимых антиоксидантных ферментов после воздействия ГБГ-7000 значительно не менялась, что говорит

о снижении способности к мобилизации антиоксидантной защиты.

Курсовое воздействие гипоксии в режиме прекодиционирования (ИНГ, ГБГ-5000) не влияло в неокортексе крыс с НУ на долгосрочную динамику содержания продуктов липидной пероксидации и компонентов пула глутатиона (рис. 3). Однако при курсовом воздействии ГБГ-5000, в отличие от курсового применения ИНГ, в неокортексе крыс с НУ наблюдалась устойчивая активация Cu,Zn-СОД (см. рис. 3). Таким образом, защитные антиоксидантные эффекты курсового применения ГБГ-5000 значительно превосходили соответствующие эффекты курсового воздействия ИНГ.

Несмотря на отсутствие при курсовом гипоксическом прекодиционировании изменений интенсивности свободнорадикальных процессов, в неокортексе крыс с НУ происходило постепенно нарастающее в процессе тренировок увеличение базового содержания

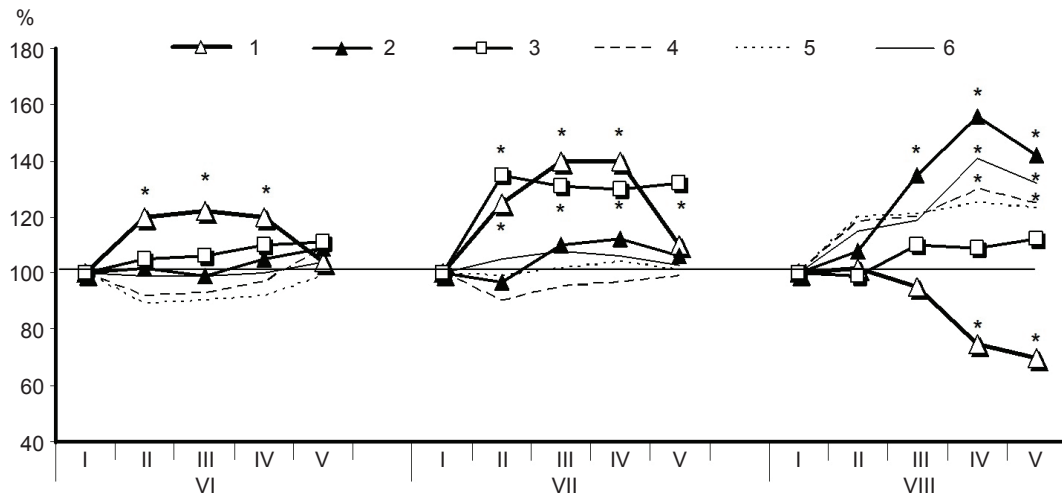


Рис. 3 Влияние курсового воздействия разных режимов гипоксии на содержание продуктов липидной пероксидации, окисленного глутатиона, активность Cu,Zn- супероксиддисмутазы и экспрессию HIF-1 α в неокортексе крыс, неустойчивых к гипоксии

1 – HIF-1 α , 2 – окисленный глутатион, 3 – Cu,Zn-супероксиддисмутаза, 4 – гидроперекиси липидов, 5 – диеновые конъюгаты, 6 – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой;

I – контроль; II – 1+24 ч; III – 3+24 ч; IV – 8+24 ч; V – 15+24 ч

1, 3, 8, 15 – количество гипоксических воздействий, 24 ч – время после гипоксических воздействий, VI – интервальная нормобарическая гипоксия в режиме прекодиционирования; VII – гипобарическая гипоксия в режиме прекодиционирования; VIII – тяжелая гипобарическая гипоксия. * P<0,05 достоверное различие с контрольной группой

HIF-1 α , достигающее максимальных значений после 8-го гипоксического воздействия (см. рис. 3). При курсовом, также как и при однократном применении гипоксических воздействий в режиме прекондиционирования, формирование HIF-1-зависимых механизмов адаптации протекало на фоне отсутствия признаков активации свободнорадикальных процессов, что ставит под сомнение необходимость их участия в механизмах отсроченной экспрессии HIF-1 α .

Противоположные эффекты были получены при курсовом применении тяжелых гипоксических воздействий (ГБГ-7000). В этом случае в неокортексе крыс с НУ наблюдалось устойчивое увеличение содержания гидроперекисных соединений, диеновых конъюгатов полиненасыщенных жирных кислот, ТБК-ПП, GSSG, которое достигало максимальных значений после 8-го воздействия (см. рис. 3). В этот же период, на пике активации свободнорадикальных процессов, развивалось устойчивое снижение (на 25–30 %) содержания HIF-1 α в КГМ, что может быть связано с активизацией убиквитиннезависимого пути деградации окислительно-модифицированного HIF-1 α [34] (см. рис. 3). При этом активность антиоксидантных ферментов неокортекса (глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, СОД) не отличалась от контрольной, но устойчивая активация процессов ПОЛ указывает на несостоятельность механизмов антиоксидантной системы неокортекса в этих условиях.

Полученные результаты позволяют предполагать, что при курсовом применении тяжелых гипоксических воздействий, сопутствующая активация свободнорадикальных процессов может быть одной из причин подавления отсроченной аккумуляции HIF-1 α и отрицательно влиять на формирование долгосрочной адаптации к гипоксии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что базовое содержание HIF-1 α в нор-

моксической ткани и интенсивность его экспрессии в гипоксических условиях зависят от фенотипа животных, т.е. генетически детерминированы. При этом в нормоксических условиях между содержанием HIF-1 α в ядерной фракции и исходной резистентностью животных к гипоксии существует обратная зависимость, свидетельствующая о фенотипических различиях путей образования и аккумуляции HIF-1 α (в системах пролилгидроксилазных реакций и сигнальных путях PI3K и MAPK-зависимого синтеза), влияющих на его участие в механизмах срочной адаптации и на формирование резистентности.

Гипоксические воздействия в режиме прекондиционирования (содержание O₂ во вдыхаемом воздухе не менее 10 %) способствуют индукции срочной экспрессии HIF-1 α (при однократном применении гипоксии) и отсроченному увеличению базового содержания HIF-1 α (при курсовом применении гипоксии) только у фенотипа крыс с НУ и отсутствует у животных с ВУ. Этот фазный процесс коррелирует с динамикой формирования у животных с НУ срочной и отсроченной резистентности к гипоксии и протекает без признаков окислительного стресса (при отсутствии активации свободнорадикальных процессов и изменения редокс-статуса ткани). Все это свидетельствует о: а) фенотипически опосредованной вовлеченности HIF-1 не только в механизмы отсроченной, но и срочной адаптации к гипоксии и б) возможности реализации сигнальной функции HIF-1 без участия АФК.

Специфическая транскрипционная функция HIF-1 α в условиях *in vivo* реализуется лишь в определенном диапазоне концентраций кислорода во вдыхаемом воздухе и не проявляется при ее снижении до значений менее 10 %. При 8 % O₂ у обоих фенотипов животных наблюдается не увеличение, а достоверное снижение содержания HIF-1 α в коре головного мозга в ранний постгипоксический период, которое нарастает у животных с НУ при многократном гипоксическом

воздействию. При этом, однако, у них сохраняется способность формировать срочную резистентность к острой гипоксии, хотя степень ее выраженности снижена сравнительно с гипоксическим прекондиционированием. В то же время при данном режиме оксигенации и у животных с НУ, и с ВУ отсутствует способность формировать отсроченную резистентность к острой гипоксии. Следовательно, формирование долгосрочных механизмов адаптации зависит от способности организма синтезировать и накапливать в этот период HIF-1 α , который является, видимо, главным регуляторным фактором, ответственным за этот процесс. Однако частичное сохранение способности организма к формированию срочной резистентности свидетельствует о том, что на стадии индукции адаптации HIF-1 α не является единственным сигнальным механизмом этого процесса.

Отсутствие активации свободнорадикальных процессов при однократном и курсовом применении гипоксических воздействий в режиме прекондиционирования ставит под сомнение необходимость их участия в механизмах срочной и отсроченной экспрессии HIF-1 α и формировании резистентности организма в этих условиях. Однако активация свободнорадикальных процессов в условиях тяжелой гипоксии (8 % O₂) может быть причиной подавления срочной экспрессии и отсроченной аккумуляции HIF-1 α .

ВЫВОДЫ

1. HIF-1 α выполняет сигнальную функцию при формировании не только долгосрочных механизмов адаптации, но и (частично) на стадии ее индукции лишь в определенном диапазоне концентраций кислорода во вдыхаемом воздухе (не менее 10% O₂) и преимущественно у животных с НУ, что указывает на фенотипическую опосредованность процесса, т.е. его генетическую детерминированность.

2. Сигнальная функция HIF-1 α при формировании срочной и долгосрочной адаптации

и резистентности организма не реализуется при концентрации кислорода менее 10%, что связано с подавлением срочной экспрессии и синтеза HIF-1 α в этих условиях.

3. Сигнальная функция HIF-1 α при гипоксических воздействиях в режиме прекондиционирования не требует участия АФК и реализуется при отсутствии признаков окислительного стресса. Однако активация свободнорадикальных процессов при тяжелых формах гипоксии (8 % O₂) может способствовать подавлению срочной экспрессии и синтеза HIF-1 α и формирования долгосрочной адаптации к гипоксии.

Ю.І. Кірова, Е.Л. Германова, Л.Д. Лук'янова

ФЕНОТИПОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ФАКТОРА, ІНДУКОВАНОГО ГІПОКСІЄЮ, І РЕДОКС-СТАТУС КЛІТИН НЕОКОРТЕКСУ ЩУРІВ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ АДАПТАЦІЇ ДО ГІПОКСІЇ

Гіпоксичні впливи в режимі прекондиціонування викликають в корі головного мозку нестійких до гіпоксії щурів фазове збільшення експресії фактора, індукованого гіпоксією (HIF-1 α). Показано, що після кожного гіпоксичного впливу спостерігається короткочасна фаза негайної експресії HIF-1 α , яка швидко нівелюється в нормоксичних умовах. Вторинне збільшення експресії розвивається через добу після чергового гіпоксичного впливу. Фазовий характер негайної та довгострокової експресії HIF-1 α корелює з динамікою формування у нестійких до гіпоксії щурів негайної та відстроченої резистентності, що дає змогу припускати залученість HIF-1 у механізми не тільки довготривалої, але й негайної адаптації до гіпоксії. Показано, що впливи гіпоксії в режимі прекондиціонування мобілізують антиоксидантну систему (індукують активацію Cu, Zn-SOD), не впливають на інтенсивність процесів ПОЛ в неокортексі (інтервальна нормобарична гіпоксія, 10 % O₂) або знижують в ранньому постгіпоксичному періоді вміст продуктів ліпопероксидації та окисненого глутатіону в клітинах неокортексу (гіпобарична гіпоксія – ГБГ-5000, 10,6 % O₂). За відсутності активізації процесів вільнорадикального і перекисного окиснення гіпоксичне прекондиціонування збільшує експресію HIF-1 α в неокортексі нестійких до гіпоксії щурів, індукує формування негайної та довготривалої адаптації до гіпоксії. Таким чином, активні форми кисню не мають визначального значення в індукції експресії HIF-1 α і формуванні адаптації до гіпоксії. У «високоостійких» тварин гіпоксичні впливи в режимі прекондиціонування не впливають на експресію HIF-1 α і формування адаптації. Впливи важкої гіпоксії (ГБГ-7000, 8 % O₂) викликають

активізацію процесів ПОЛ в неокортексі нестійких до гіпоксії щурів. В умовах домінування прооксидантних систем над антиоксидантними спостерігається зниження експресії HIF-1 α в неокортексі, порушення формування термінової та довготривалої адаптації до гіпоксії.

Ключові слова: HIF-1 α , неокортекс, гіпоксичне прекодиціювання, важка гіпоксія, високостійкі і нестійкі до гіпоксії щури, негайна і довготривала адаптація до гіпоксії, перекисне окиснення ліпідів, гідроперекиси ліпідів, кон'юговані дієни, окиснений глутатіон, продукти, що реагують з тіобарбітуровою кислотою.

Yu.I. Kirova, E.L. Germanova, L.D. Lukyanova

PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF HIF-1 ALPHA EXPRESSION AND REDOX STATUS IN RAT NEOCORTICAL CELLS AT DIFFERENT STAGES OF ADAPTATION TO HYPOXIA

Hypoxic preconditioning induces two-phase increase of HIF-1 α expression in the neocortex of low-resistance rats. The first, brief phase appears after each hypoxic episode and rapidly disappears in normoxic conditions. The second increase in of HIF-1 α expression occurs in 24 hours after the hypoxic episode. The phase-nature of HIF-1 α expression corresponds to the dynamics of urgent and long-term resistance in low-resistance rats, which suggests the HIF-1 α involvement in mechanisms of urgent and long-term adaptation. It was found that in the mode of preconditioning, hypoxic treatments mobilized the anti-oxidant system (activated Cu, Zn-SOD) and had no effect on the intensity of lipid peroxidation processes in neocortex (INH, 10% O₂) or even decreased the content of lipid peroxidation products and oxidized glutathione in neocortical cells in the early post-hypoxic period (HBH-5000, 10.5% O₂). Thus, ROS do not play a key role in the induction of HIF-1 α expression and fast-response/long-term adaptation to O₂ deficiency in hypoxia-sensitive animals. In high-resistance rats, hypoxia preconditioning does not influence the HIF-1 α protein expression and the adaptation. Severe hypoxic modes (HBH-7000, 8% O₂) caused activation of lipid peroxidation processes in neocortex of hypoxia-sensitive rats. With the pro-oxidant systems dominating over the anti-oxidant ones, the neocortical expression of HIF-1 α was found to decrease, which was accompanied by the impairment of the mechanisms of fast-response/long-term adaptation to hypoxia.

Key words: HIF-1 α , neocortex, preconditioning hypoxia, severe hypoxia, high-resistance rats, low-resistance rats, urgent and long-term adaptation to hypoxia, lipid peroxidation, lipid hydroperoxides, conjugated dienes, thiobarbituric acid reactive substances, oxidized glutathione.

*Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Russian Academia Medical Sciences*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Феноти-

пические особенности динамики содержания HIF-1 α в неокортексе крыс при различных режимах гипоксии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2012. – **154**, №12. – С. 681–686.

2. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2011. – №1. – С. 3–19.
3. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического прекодиционирования: роль гипоксического периода и реоксигенации // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – **147**, №4. – С. 380–384.
4. Лукьянова Л.Д., Дудченко А.М. Триггерная роль энергетического обмена в каскаде функционально-метаболических нарушений при гипоксии. – В кн.: Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты / Под ред. Лукьяновой Л.Д., Ушакова И.Б. – М.: Истоки, 2004. – С. 51–84.
5. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И. Влияние гипоксического прекодиционирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2011. – **151**, №3. – С. 292–296.
6. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции // Биол. мембраны. – 2012. – **29**, №4. – С. 238–252.
7. Чернобаева Г.Н., Лукьянова Л.Д. Роль индивидуальной резистентности к гипоксическому фактору при поиске антигипоксантов и оценке эффективности их действия // В кн.: Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. – М., 1989. – С. 160–164.
8. Abramov A.Y., Scorziello A., Duchon M.R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation // J. Neurosci. – 2007. – **27**, №5. – С. 1129–1138.
9. Althausen S., Mengesdorf T., Mies G. Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2 α , elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice // J. Neurochem. – 2001. – №78. – С. 779–787.
10. Bell E.L., Klimova T.A., Eisenbart J., Moraes C.T., Murphy M.P., Budinger G.R., Chandel N.S. The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production // J. Cell Biol. – 2007. – №177. – P. 1029–1036.
11. Boveris A., Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen // Biochem. J. – 1973. – №134. – P. 707–716.
12. Bruick R.K. O₂ sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor // Genes & Development. – 2003. – №17. – P. 2614–2623.
13. Calvert J.W., Cahill J., Yamaguchi-Okada M., Zhang JH. Oxygen treatment after experimental hypoxia-ischemia in neonatal rats alters the expression of HIF-1 α and its

- downstream target genes // *J. Appl. Physiol.* – 2006. – №101. – P. 853–865.
14. Dringen R., Gutterer J.M. Glutathione reductase from bovine brain // *Methods Enzymol.* – 2002. – №348. – P. 281–288.
 15. Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein // *Free Radic. Res. Commun.* – 1989. – №6. – P. 67–75.
 16. Eyer P., Podhradsky D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent // *Anal. Biochem.* – 1986. – №153. – P. 57–66.
 17. Griendling K.K., Sorescu D., Lassegue B., Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and Pathophysiology // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – №20. – P. 2175–2183.
 18. Haddad J.J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors // *Cell Signal.* – 2002. – №14. – P. 879–897.
 19. Haddad J.J., Land S.C. O₂-evoked regulation of HIF-1 and NF- κ B in perinatal lung epithelium requires glutathione biosynthesis // *Amer. J. Physiol. Lung. Cell Mol Physiol.* – 2000. – №278. – P. L492–L503.
 20. Haddad J.J., Olver R.E., Land S.C. Antioxidant/prooxidant equilibrium regulates HIF-1 alpha and NF-kappa B redox sensitivity evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells // *J. Biol. Chem.* – 2000. – №275. – P. 21130–21139.
 21. Hermes-Lima M., Willmore W.G., Storey K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation // *Free Radical Biology & Medicine.* – 1995. – 19, №3. – P. 271–280.
 22. Kaelin W.G., Ratcliffe P.J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway // *Mol. Cell.* – 2008. – №30. – P.393–402.
 23. Katschinski D.M., Le L., Schindler S.G., Thomas T., Voss A.K., Wenger R.H. Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1 alpha stabilization // *Cell Physiol. Biochem.* – 2004. – №14. – P. 351–360.
 24. Lukyanova L.D., Dudchenko A.M., Tsybina T.A., Germanova E.L., Tkatchuk E.N. Mitochondrial signaling in Adaptation to Hypoxia. – In: *Adaptation Biology and Medicine / Eds Lukyanova L.D., Takeda N., Singal P.K.* – Publishing House New Dehli, India, 2008. – 5. – P. 245–260.
 25. Lukyanova L.D., Germanova E.L., Kirova Yu.I. The Signal Function of Succinate and Free Radicals in Mechanisms of Preconditioning and Long-term Adaptation to Hypoxia. – In: *Adaptation Biology and Medicine / Eds Wang P., Kuo C.-H., Takeda N., Singal P.K.* – Publishing House New Dehli, India, 2011. – 6. – P. 251–277.
 26. Lukyanova L.D., Germanova E.L., Kirova J.I., Lysko A.I. The signal function of succinate and free radicals in mechanisms of preconditioning and long-term adaptation to hypoxia. – In: *Adaptation Biology and Medicine / Eds Wang P., Kuo C.-H., Takeda N., Singal P.K.* – Publishing House New Dehli, India, 2009. – 1. – P. 45–48.
 27. Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R., Ratcliffe P.J. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia inducible factors for oxygen-dependent proteolysis // *Nature.* – 1999. – №399. – P. 271–275.
 28. Okawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* – 1979. – №95. – P. 351–358.
 29. Ozdemir G., Ozden M., Maral H., Kuskay S., Cetinalp P., Tarkun I. Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria // *Ann. Clin. Biochem.* – 2005. – №42. – P. 99–104.
 30. Paky A., Michael J.R., Burke-Wolin T.M., Wolin M.S., Gurtner G.H. Endogenous production of superoxide by rabbit lungs: effects of hypoxia or metabolic inhibitors // *J. Appl. Physiol.* – 1993. – №74. – P. 2868–2874.
 31. Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy // *Cancer.* – 2003. – №3. – P. 721–732.
 32. Semenza G.L. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis // *Blood.* – 2009. – 114, №10. – P. 2015–2019.
 33. Selak M.A., Armour S.M., MacKenzie E.D., Boulahbel H., Watson D.G., Mansfeld K.D., Pan Y., Simon M.C., Thompson C.B., Gottlieb E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase // *Cancer Cell.* – 2005. – №7. – P. 77–85.
 34. Shringarpure R., Grune T., Mehlhase J., Davies K.J. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome // *J. Biol. Chem.* – 2003. – №1. – P. 311–318.
 35. Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia // *FASEB J.* – 2001. – №15. – P. 2445–2453.
 36. Torres M., Forman H.J. Redox signaling and the MAPK-kinase pathways // *Biofactors.* – 2003. – №17. – P. 287–296.
 37. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species // *J. Physiol.* – 2003. – №15. – P. 335–344.
 38. Tuttle S.W., Maity A., Oprysko P.R., Kachur A.V., Ayene I.S., Biaglow J.E., Koch C.J. Detection of reactive oxygen species via endogenous oxidative pentose phosphate cycle activity in response to oxygen concentration // *J. Biol. Chem.* – 2007. – 282, №51. – P. 36790–36796.
 39. Ukedo H., Maeda S., Ishii T., Sawamura M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-1-((phenylamino)-carbonyl--3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase // *Anal. Biochem.* – 1997. – №251. – P. 206–209.
 40. Vargas S.L., Toma I., Kang J.J., Meer E.J., Peti-Peterdi J. Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release // *J. Amer. Soc. Nephrol.* – 2009. – №20. – P. 1002–1011.

41. Wang G.L., Jiang B.H., Semenza G.L. Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1995. – №2. – P. 550–556.
42. Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – №92. – P. 5510–5514.

*ФГБУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии»
РАМН, Москва
E-mail: bioenerg@mail.ru*

*Материал поступил в
редакцию 31.04.2013*