

© Кирова Ю.И., Германова Э.Л., 2018
УДК 616.152.21:616.831.31: 616-003.96:599.323.4

Кирова Ю.И., Германова Э.Л.

Взаимодействие HIF1 α с белками теплового шока HSP90 и HSP70 в коре головного мозга при гипоксии

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Цель исследования: изучить динамику экспрессии HIF1 α , HSP90 и HSP70 в коре головного мозга (КГМ) крыс с генетически детерминированными различиями в толерантности к дефициту кислорода при воздействиях гипобарической гипоксии разной тяжести, продолжительности и кратности. **Методика.** Работа выполнена на самцах белых беспородных крыс, типированных по чувствительности к острой гипобарической гипоксии, моделируемой в барокамере (3% O₂; 190 мм рт.ст.; 11,5 тыс. м). Гипобарическую гипоксию (ГБГ) разной тяжести моделировали в барокамере проточного типа. Давление в камере соответствовало «высотам»: 3000 м (14% O₂, 526 мм рт.ст.), 5000 м (10% O₂, 380 мм рт.ст.), 7000 м (8% O₂, 290 мм рт.ст.). Продолжительность экспозиции при однократном воздействии варьировала от 15 мин до 4 ч (15, 30, 45, 60 мин; 2, 4 ч), при курсовом применении ГБГ (ежедневные сеансы, 20 сут.) — 60 мин. С помощью вестерн-блоттинга определяли содержание HSP90 и HSP70 в цитоплазматическом экстракте, а HIF1 α — в ядерном экстракте КГМ. **Результаты.** Впервые показано, что уровень базовой экспрессии HIF1 α и HSP90 в условиях нормоксии выше в КГМ неустойчивых к гипоксии крыс в сравнении с устойчивыми, что указывает на высокую значимость HIF1 α -HSP90-зависимых механизмов в поддержании кислородного гомеостаза КГМ низкорезистентных к гипоксии крыс в условиях физиологической нормы. Полученные данные впервые демонстрируют, что в условиях гипоксии разной тяжести и продолжительности сопряженно меняется паттерн срочной экспрессии HSP90 и HIF1 α в КГМ — от индукции в условиях гипоксии слабой (14% O₂, 526 мм рт.ст.) и средней тяжести (10% O₂, 380 мм рт.ст.) до супрессии в условиях тяжелой гипоксии (8% O₂, 290 мм рт.ст.). При курсовом применении неповреждающей гипоксии (10% O₂/14% O₂, 60 мин, 20 сут.) прогрессирующее увеличение содержания HIF1 α в КГМ сопровождается подавлением экспрессии HSP90 и HSP70, что свидетельствует о возможной отрицательной регуляции со стороны HIF1. Данные исследования динамики экспрессии HIF1 α , HSP90 и HSP70 при однократном и многократном применении неповреждающей гипоксии позволяют заключить, что для индукции HIF1 α -HSP90-зависимых механизмов адаптации необходимо применять короткие курсы (3—8 сут.) часовых гипоксических воздействий средней тяжести. Тяжелая гипоксия при многократном применении вызывает устойчивое подавление экспрессии HSP90, HSP70 и HIF1 α в КГМ и срыв HIF1 α -HSP90-зависимых механизмов адаптации к дефициту кислорода. **Заключение.** Применение разных режимов гипобарической гипоксии представляет собой потенциальный подход модуляции стабильности комплекса HIF1 α -HSP90 и эффективности HIF1-зависимых механизмов адаптации к дефициту кислорода.

Ключевые слова: гипобарическая гипоксия, белки теплового шока (HSP90, HSP70); фактор транскрипции HIF1; кора головного мозга; крысы с генетически детерминированными различиями в толерантности к гипоксии.

Для цитирования: Кирова Ю.И., Германова Э.Л. Взаимодействие HIF1 α с белками теплового шока HSP90 и HSP70 в коре головного мозга при гипоксии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(3): 4—11.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.03.4-11

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Кирова Юлия Игоревна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр., лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии ФГБНУ НИИОПП, e-mail: bioenerg@mail.ru

Поступила 16.03.2018

Kirova Yu.I., Germanova E.L.

Interaction of HIF1 α with heat shock proteins HSP90 and HSP70 in the cerebral cortex during hypoxia

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, 125315, Moscow, Russia

The aim of the study was to investigate the dynamics of expression of HIF1 α , HSP90 and HSP70 in the cerebral cortex (CC) of rats with genetically determined differences in tolerance to oxygen shortage in hypobaric hypoxia of different se-

verity, duration and multiplicity. **Methods.** The study was conducted on white mongrel male rats, divided into groups by sensitivity to acute hypobaric hypoxia (3% O₂, 190 mm Hg, 11.5 km). Hypobaric hypoxia (HBH) of different severity was modeled in a flow-type altitude chamber. The pressure in the chamber simulated "altitudes" of 3,000 m (14% O₂, 526 mm Hg), 5,000 m (10% O₂, 380 mm Hg), and 7,000 m (8% O₂, 290 mm Hg). Duration of a single exposure varied from 15 min to 4 h (15, 30, 45, 60 min, 2, and 4 h), and each exposure in an HBH course (daily sessions, 20 days) lasted for 60 min. Contents of HSP90 and HSP70 were measured in the CC cytoplasmic extract and content of HIF1 α — in the CC nuclear extract using Western blotting. **Results.** The study showed for the first time that the baseline expression of HIF1 α and HSP90 in normoxia was higher in CC of hypoxia low-resistance (LR) rats than in high-resistance rats, which indicated a high significance of HIF1 α -HSP90-dependent mechanisms in maintaining CC oxygen homeostasis in LR rats under normal physiological conditions. In hypoxia of different severity and duration, the pattern of urgent expression of HSP90 and HIF1 α changed from induction in mild (14% O₂, 526 mm Hg) and moderate (10% O₂, 380 mm Hg) hypoxia to suppression in severe hypoxia (8% O₂, 290 mm Hg). During the course of repeated, non-damaging hypoxia (10% O₂/14% O₂, 60 min, 20 days), a progressive increase in the content of HIF1 α was associated with depressed expression of HSP90 and HSP70, which suggested a possible negative regulation by HIF1. Studying changes in HIF1 α , HSP90 and HSP70 expression during single and repeated exposures to non-damaging hypoxia suggested that short courses (3—8 days) of moderate 60-min hypoxic exposures could be used to induce HIF1 α -HSP90-dependent adaptive mechanisms. Repeated severe hypoxia caused a steady suppression of HSP90, HSP70 and HIF1 α expression and failure of HIF1 α -HSP90-dependent mechanisms of adaptation to oxygen deficiency. **Conclusion.** Using different modes of hypobaric hypoxia is a potential approach to modulation of HIF1 α -HSP90 complex stability and effectiveness of HIF1-dependent mechanisms of adaptation to oxygen deficiency.

Key words: hypobaric hypoxia, heat shock proteins (HSP90, HSP70); transcription factor HIF1; cerebral cortex; rats with genetically determined differences in hypoxia tolerance.

For citation: Kirova Yu.I., Germanova E.L. Interaction of HIF1 α with heat shock proteins HSP90 and HSP70 in the cerebral cortex during hypoxia. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(3): 4—11. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2018.03.4-11

For correspondence: Yuliya I. Kirova, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russian Federation, e-mail: bioenerg@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest. The manuscript (or any part of it) has not been published previously or is not under consideration for publication elsewhere.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Kirova Yu.I., <https://orcid.org/0000-0002-2436-3661>
Germanova E.L., <https://orcid.org/0000-0003-1191-8477>

Received 16.03.2018

Введение

Гипоксический стресс избирательно активизирует экспрессию белков, вовлеченных в формирование компенсаторно-адаптивных реакций. При этом возрастает регуляторная роль стресс-белков или белков теплового шока (heat shock protein, HSP), выполняющих функцию молекулярных шаперонов в фолдинге, рефолдинге, стабилизации и активации белков и, прежде всего, транскрипционного гипоксического фактора HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) — ключевого регулятора экспрессии проадаптивных генов [1].

В настоящее время интенсивно исследуется роль HSP90 в регуляции экспрессии и активности HIF1. HSP90 — наиболее многочисленная группа шаперонов в клетке, активность которых направлена на белки, причастные к сигнальной трансдукции. HSP90 контролируют конформацию, активность, трансмемб-

ранный перенос транскрипционных факторов, рецепторов, протеинкиназ, играют ключевую роль в выживаемости, пролиферации, дифференциации клеток. HSP90 функционируют в комплексе с HSP70, которые индуцируются при повреждающих воздействиях и рассматриваются как индикаторы клеточного стресса. HSP70 солибилизируют агрегированные белки, осуществляют их фолдинг и поставляют для заключительного этапа тонкой конформационной настройки (созревания) шаперонам HSP90 [2].

Согласно данным литературы, HSP90 и HSP70 могут комплексоваться с гипоксическим транскрипционным фактором HIF1, потенцируя его активность и экспрессию. HSP90 и HSP70 взаимодействуют с кислородзависимым доменом деградации ODD (oxygen dependent degradation domain) кислород-регулируемой субъединицы HIF1 α , препятствуют свя-

зыванию фактора VHL (Von Hippel-Lindau tumour suppressor protein), инициирующего O₂-зависимую деградацию, в результате чего время полужизни HIF1 α в условиях отсутствия гипоксии заметно увеличивается [3].

В 2007 г. Semenza G.L. и соавт. идентифицировали рецептор активированной протеинкиназы C1 (receptor for activated C kinase 1, RACK1) как фактор, инициирующий O₂-независимую убиквитин-протеасомную деградацию HIF1 α . HSP90 конкурирует с RACK1 за связывание с PAS-A субдоменом HIF1 α и способствует аккумуляции транскрипционного фактора в условиях гипоксии [1, 4].

Способность HSP90 стабилизировать и активировать HIF1 α даже в условиях нормоксии, сверхэкспрессия HSP90 в опухолях, потенцирование HIF1-зависимых процессов пролиферации и устойчивости к апоптозу, положительная корреляция между экспрессией HSP90 и инвазивностью опухолей, сформировали представление о HSP90 как «раковых шаперонах» [5, 6]. Однако разработка подходов модуляции экспрессии HSP90 как регуляторов активности HIF1 α имеет высокую актуальность не только в области онкологии с целью супрессии HSP90, но и в сфере медицины экстремальных (критических) состояний, когда необходимо повысить эффективность HIF1-зависимых механизмов адаптации к дефициту кислорода.

Известно, что комплекс HSP90-HSP70 в зависимости от силы/продолжительности стресс-воздействия может не только осуществлять фолдинг белков-«клиентов», но и провоцировать их деградацию. Связывание с убиквитинлигазой CHIP (carboxyl-terminal Hsp70-interacting protein) предопределяет переключение активности HSP90-HSP70 с фолдинговой на протеолитическую, причем CHIP-зависимой убиквитинации могут подвергаться молекулы шаперонов HSP90 и HSP70 [7].

Недавно было показано, что в условиях окислительного стресса происходит глутатионилирование и деградация HSP90 [8]. Еще один механизм окислительного повреждения HSP90 — расщепление молекулы с последующей утратой активности и деградацией белков-«клиентов» [5]. Таким образом, HSP90 являются уязвимой мишенью окислительного стресса.

Рассмотренные факты позволяют оценить сложность и неоднозначность эффектов гипоксического стресса на экспрессию HSP90, HSP70, HIF1 α и их взаимодействие. В настоящее время отсутствуют исследования, в которых была бы детально исследована *in vivo* динамика экспрессии HSP90 и HSP70 при гипоксических воздействиях разной тяжести и соотнесена с особенностями экспрессии HIF1 α у животных с генетически детерминированными различиями в толерантности к гипоксии.

Цель исследования — изучение особенностей взаимодействия HIF1 α , HSP90 и HSP70 в коре головного мозга животных с разной чувствительностью к дефициту кислорода при разных гипоксических режимах и длительности гипоксического воздействия.

Методика

Работа выполнена на самцах белых беспородных крыс массой 250—300 г, выращенных в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» при свободном доступе к воде и пище, естественном чередовании суточной освещенности. Содержание животных и выполнение экспериментов осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными этической комиссией ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», которые соответствуют требованиям Всемирного общества защиты животных и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Животные были предварительно (за 4 нед. до эксперимента) типированы по их чувствительности к острой гипобарической гипоксии, моделируемой в барокамере (3% O₂; 190 мм рт.ст.; 11,5 тыс. м) [9]. Крысы, способные пережить условия острой гипоксии в течение 1—2 мин до появления патологических типов дыхания, составили группу низкоустойчивых (НУ) животных, в течение 10—20 минут — высокоустойчивых (ВУ). При проведении экспериментов формировали группы контроля (n = 8) и опытные группы (n = 6).

Моделирование гипоксии. Гипобарическую гипоксию (ГБГ) разной тяжести моделировали в барокамере проточного типа. Давление в камере соответствовало «высотам»: 3000 м (14% O₂, 526 мм рт.ст.; ГБГ₃₀₀₀), 5000 м (10% O₂, 380 мм рт.ст.; ГБГ₅₀₀₀), 7000 м (8% O₂, 290 мм рт.ст.; ГБГ₇₀₀₀). Продолжительность экспозиции при однократном воздействии варьировала от 15 мин до 4 ч (15, 30, 45, 60 мин; 2, 4 ч), при курсовом применении ГБГ (ежедневные сеансы, 20 сут.) — 60 мин.

Вестерн-блот анализ образцов ткани коры головного мозга. После гипоксического воздействия крыс декапитировали, кору головного мозга (КГМ) отделяли на льду, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C. С помощью вестерн-блоттинга определяли содержание HSP90 и HSP70 в цитоплазматическом экстракте, а HIF1 α — в ядерном экстракте КГМ [10]. Белки подготовленных проб разделяли в 10% (HSP70, HSP90) и 8% (HIF1 α) полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану электроолюющей. Мембрану инку-

бирова́ли с первичными поликлональными антителами (Santa Cruz Biotechnology, США; sc-7947, sc-33575, sc-10790; разведение 1:500) и вторичными антителами (sc-2030; разведение 1:5000), конъюгированными с пероксидазой хрена. Детектирование белков осуществляли в реакции с ECL-реагентами (Pierce Biotechnology, Inc., США) на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop. О содержании иско́мых белков судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Результат выражали в относительных денситометрических единицах (ОДЕ).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 6,0» с использованием критерия Стьюдента и непараметрического рангового U-критерия Уилкоксона (Уилкоксона—Манна—Уитни). Различия между сравниваемыми группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для анализа сопряженных биохимических показателей рассчитывали коэффициент корреляции (r) (коэффициент Пирсона при нормальном распределении данных или коэффициент корреляции рангов Спирмена при распределении данных отличном от нормального).

Результаты и обсуждение

В условиях нормоксии HSP90, HSP70, HIF1 α были обнаружены во всех исследованных тканях НУ и ВУ крыс (рис. 1). Наиболее высокий базовый уровень тестируемых белков выявляли в печени, почках, миокарде и тимусе. В легком, мышце, селезенке при высоком уровне экспрессии HSP90 и HSP70 содержание HIF1 α оказалось следовым. КГМ была единственной тканью из исследованных, в которой высокий уровень экспрессии HIF1 α выявляли при низком базовом содержании HSP90 и HSP70.

Таким образом, в условиях нормоксии положительной корреляции между содержанием HSP90/HSP70 и HIF1 α не было установлено. По-видимому, высокий базовый уровень HSP90/HSP70, задействованных в контроле фолдинга белков, отражает высокие скорость и объем базового синтеза белка в ткани. Действительно, по данным литературы в физиологических условиях в зрелом мозге скорость обновления белков ниже в сравнении с другими тканями [2, 11].

Важно, что в КГМ НУ крыс содержание HIF1 α было значимо выше (в 1,5—1,7 раза) по сравнению с ВУ (рис. 1, В). Уровень HSP90 в КГМ НУ крыс был несколько выше в сравнении с ВУ, однако отличия не были статистически значимыми. При сопоставлении полученных данных с более ранними исследованиями редокс-статуса КГМ НУ и ВУ крыс

[12] нами была обнаружена прямая зависимость между базовой толерантностью организма к гипоксии и интенсивностью процессов свободнорадикального окисления в КГМ и обратная — с уровнем экспрессии HIF1 α и HSP90. Так, наиболее высокий уровень экспрессии HIF1 α и HSP90 отмечался в КГМ НУ крыс, в то время как содержание окисленного глутатиона и гидроперекисных метаболитов было в 1,2—1,3 раза ниже в сравнении с ВУ крысами [12, 13]. Данные позволяют предполагать высокую значимость HIF1 α -HSP90-зависимых механизмов в поддержании кислородного гомеостаза КГМ НУ крыс в условиях нормоксии.

Однократное воздействие слабой гипоксии (14% O₂; ГБГ₃₀₀₀) и гипоксии средней тяжести (10% O₂, ГБГ₅₀₀₀) индуцировало экспрессию HSP90 в КГМ НУ крыс, которая достигала максимальных значений

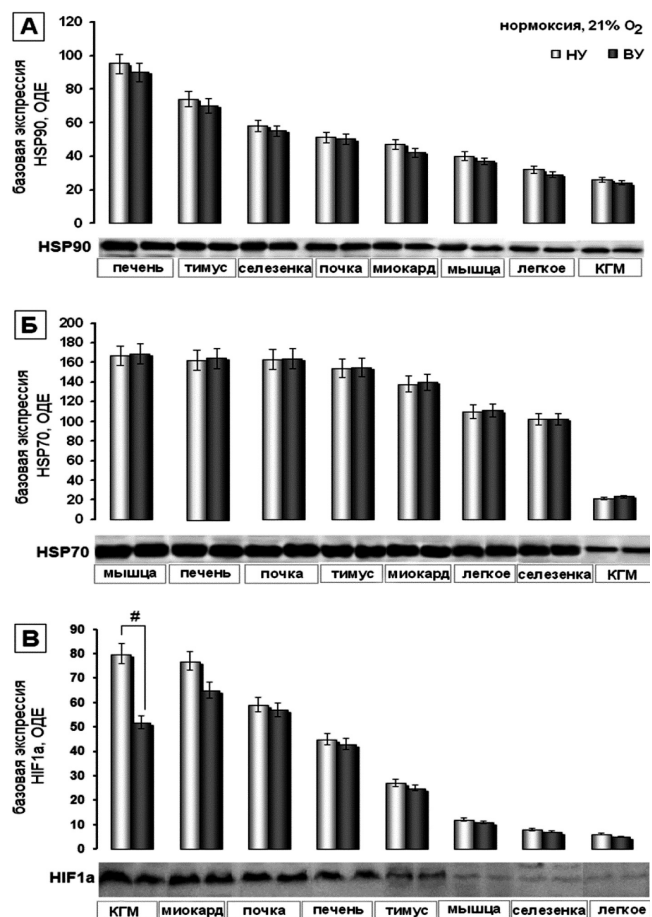


Рис. 1. Базовая (в условиях нормоксии) экспрессия HSP90 (А), HSP70 (Б), HIF1 α (В) в тканях низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) к гипоксии крыс.

Представлены репрезентативные вестерн-блоты и их количественная оценка. ОДЕ — относительные денситометрические единицы; # — статистически значимые различия между фенотипами крыс ($p < 0,01$).

через 60 мин экспозиции (130%, $p < 0,01$) и снижалась в последующие 3 ч до базового уровня (рис. 2, А, Б).

Динамика гипоксической экспрессии HSP90 была сходна с динамикой экспрессии HIF1 α в тех же условиях. Корреляционная зависимость была сильной положительной (таблица). Аналогичные изменения наблюдались в КГМ ВУ крыс, хотя они были менее выражены (рис. 2, А, Б).

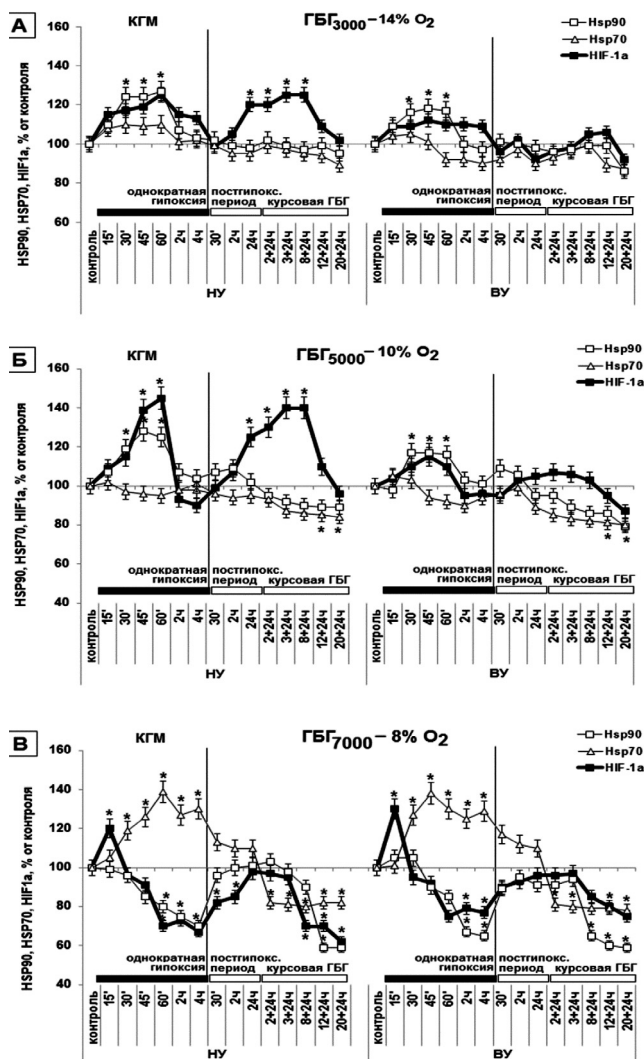


Рис. 2. Влияние однократного и курсового применения «слабой» гипоксии (А), гипоксии «средней тяжести» (Б) и «тяжелой» (В) гипоксии на экспрессию HSP90, HSP70 и HIF1 α в коре головного мозга (КГМ) низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) к гипоксии крыс (% от контроля, принятого за 100%). ГБ — гипобарическая гипоксия. По оси абсцисс обозначена продолжительность однократного гипоксического воздействия (в минутах — 15, 30, 45, 60; в часах — 2, 4), продолжительность постгипоксического периода после однократного воздействия гипоксии (30 мин, 2 ч, 24 ч), количество дней применения одночасового гипоксического воздействия (забор ткани КГМ через 24 ч реоксигенации). По оси ординат — % к контролю (100%). * — статистически значимые отличия от контроля ($p < 0,01$).

Экспрессия HSP70 в КГМ НУ и ВУ крыс в условиях 4-часового однократного воздействия гипоксии слабой и средней тяжести (14% O₂, 10% O₂) не менялась (рис. 2, А, Б), что позволяет предполагать сохранение конформационной стабильности белковых структур в этих условиях и расценивать неизменность экспрессии HSP70 как молекулярный критерий неповреждающих гипоксических воздействий.

При однократном воздействии тяжелой гипоксии (8% O₂, ГБ₇₀₀₀) в КГМ НУ и ВУ крыс через 45—60 мин экспозиции и в последующие часы гипоксического воздействия наблюдалось прогрессирующее снижение уровня HSP90 до существенно более низких, чем в контроле значений (на 40%; $p < 0,01$), одинаковое в обеих группах животных. Параллельно этому процессу происходило снижение экспрессии HIF1 α (рис. 2, В).

Срочная гипоксическая экспрессия HSP70 в КГМ НУ и ВУ крыс в условиях тяжелой гипоксии резко увеличивалась в первые 30 мин, достигала максимума в течение часа (130—140%, $p < 0,01$) и стабилизировалась на этом уровне в последующие часы (рис. 2, В).

Таким образом, между экспрессией HSP90 и HIF1 α в КГМ НУ и ВУ крыс в условиях тяжелой гипоксии корреляция была положительной, а между HSP70 и HIF1 α — отрицательной (таб.).

Полученные данные о сопряженной положительной и отрицательной динамике срочной экспрессии HSP90 и HIF1 α в условиях, неповреждающей (14% O₂, 10% O₂) и тяжелой (8% O₂) гипоксии, соответственно, свидетельствуют о существовании сходных механизмов регуляции экспрессии этих белков в использованных гипоксических условиях.

Известно, что в условиях гипоксии аккумуляция HIF1 α связана, в первую очередь, с блокированием O₂-зависимой убиквитин-протеасомной деградации, инициируемой HIF1 α -специфичными пролилгидроксилазами [1]. По данным Cummins E.P. и соавт. пролилгидроксилазы задействованы также в O₂-зависимой деградации киназы ингибитора транскрипционного фактора NF κ B (I κ B (inhibitor of κ B) kinase β) [14]. В условиях гипоксии I κ B-киназа фосфорилирует ингибитор NF κ B, что сопровождается высвобождением NF κ B из неактивного комплекса NF κ B-I κ B, транслокацией транскрипционного фактора в ядро и активацией генов HSP90 и HIF1 α [15—17]. Таким образом, срочная сопряженная индукция HIF1 α и HSP90 в условиях слабой и умеренной гипоксии обусловлена единым механизмом ингибирования активности пролилгидроксилаз. Важно отметить, что янтарная кислота (сукцинат), количество которой увеличивается в условиях гипоксии, оказывает ингибирующее действие на пролилгидроксилазы. Это обстоя-

тельство позволяет предположить, что не только гипоксическая индукция HIF1 α [1, 18], но и HSP90 является сукцинатзависимой.

В условиях тяжелой повреждающей гипоксии (8% O₂, ГБГ₇₀₀₀), сопряженной с развитием окислительного стресса [19], нами было обнаружено снижение уровня HSP90 и HIF1 α . Полученные данные согласуются с известными представлениями о высокой уязвимости HSP90 в условиях окислительного стресса и энергодефицита. HSP90 подвергается глутатионилированию и протеолизу, окислительному расщеплению, CHIP-зависимой убиквитинации и последующей протеасомной деградации [5, 7, 8]. В условиях окислительного стресса и энергодефицита механизм CHIP-зависимой убиквитин-протеасомной деградации является единым как для HSP90, так и белков-«клиентов», в частности HIF1 α [20]. Для HIF1 α также описан механизм деградации в 20S протеасоме по АТФ-независимому механизму (без убиквитинации) [21].

Выявленный нами при *тяжелой гипоксии* реципрокный характер изменений экспрессии HSPs — супрессия HSP90 и гиперэкспрессия HSP70 — отражает один из базовых механизмов регуляции экспрессии HSP70 в условиях окислительного клеточного повреждения. По данным литературы, быстрая деградация HSP90 в условиях окислительного стресса [5, 7, 8] сопровождается увеличением экспрессии HSP70. Известно, что HSP90 как шаперон сигнальных белков формирует комплекс с HSF1 (heat shock factor 1; фактор транскрипции, ключевой регулятор экспрессии HSP70). Окислительная и CHIP-зависимая деградация HSP90 сопровождается высвобождением HSF1, олигомеризацией, транслокацией в ядро и активацией гена HSP70 [22]. Таким образом, обнаруженная нами в условиях тяжелой гипоксии сверхэкспрессия HSP70, свидетельствует о быстром включении механизмов клеточного повреждения при данном гипоксическом режиме.

В *постгипоксическом периоде* при *курсовом* применении *слабой гипоксии* (14% O₂, 1 ч, 20 ежедневных воздействий) в КГМ НУ и ВУ крыс содержание

HSP90 и HSP70 не отличалось от нормы (рис. 2, А). Таким образом, механизмы O₂-независимой индукции HIF1 α , которые реализуются в постгипоксическом периоде в КГМ НУ крыс (рис. 2, А) не связаны с up-регуляцией HSP90/HSP70.

Курсовое применение гипоксии *средней тяжести* (10% O₂, 1ч, 20 ежедневных воздействий) сопровождалось снижением уровня HSP90 и HSP70, которое усиливалось с увеличением числа гипоксических воздействий (рис. 2, Б). Уровень HIF1 α в КГМ НУ крыс, несмотря на выраженную индукцию после 1—8 воздействий, также снижался до базового уровня (после 12-го сеанса) либо ниже контроля (после 20-го воздействия). В КГМ ВУ крыс индукция HIF1 α была слабой, но также сопровождалась снижением экспрессии HSP90 и HSP70 (рис. 2, Б).

Установленный нами эффект сопряженного умеренного подавления экспрессии HSP90 и HSP70 в условиях гипоксии средней тяжести, который развивается при одновременной индукции HIF1 α , может отражать существование отрицательной регуляции HSP90/HSP70 со стороны HIF1 α . Известно, что отрицательная обратная связь проявляется в механизмах регуляции экспрессии HIF1 α . Так, HIF1 активирует гены пролилгидроксилаз, вовлеченных в O₂-зависимую деградацию HIF1 α [1]. Поскольку пролилгидроксилазы ограничивают механизмы NF κ B-зависимой индукции HSP90, можно предположить вовлеченность HIF1 в подавление экспрессии HSP90 [15—17]. Имеются исследования, демонстрирующие, что HIF1 является негативным регулятором HSP70 [23].

Таким образом, обобщая данные исследования динамики экспрессии HIF1 α , HSP90 и HSP70 при однократном и курсовом применении неповреждающей гипоксии можно заключить, что для индукции HIF1 α -HSP90-зависимых механизмов адаптации необходимо применять короткие курсы (3—8 сут.) часовых гипоксических воздействий средней тяжести (10% O₂).

Таблица

Корреляционная зависимость между динамикой экспрессии HIF1 α и белков теплового шока HSP90/HSP70 в КГМ НУ и ВУ крыс при однократном воздействии разных режимов ГБГ

| | HSP90 | | | HSP70 | | |
|----|---|---|--|---|---|--|
| | ГБГ ₃₀₀₀ (14% O ₂ ; 4 ч) | ГБГ ₅₀₀₀ (10% O ₂ ; 4 ч) | ГБГ ₇₀₀₀ (8% O ₂ ; 4 ч) | ГБГ ₃₀₀₀ (14% O ₂ ; 4 ч) | ГБГ ₅₀₀₀ (10% O ₂ ; 4 ч) | ГБГ ₇₀₀₀ (8% O ₂ ; 4 ч) |
| НУ | +0,82 | +0,91 | +0,91 | +0,17 | +0,26 | -0,85 |
| ВУ | +0,49 | +0,83 | +0,73 | +0,15 | +0,18 | -0,69 |

Примечание. В таблице представлены значения коэффициента корреляции. ГБГ — гипобарическая гипоксия. КГМ — кора головного мозга. НУ — низкоустойчивые, ВУ — высокоустойчивые к гипоксии крысы

Тяжелая гипоксия (8% O₂, 1 ч, 20 сут.), сопряженная с энергодефицитом и развитием окислительного стресса [12], сопровождается после первых 3 сут. курса обратимым подавлением экспрессии HSP90 и HIF1 α , но с увеличением числа воздействий до 8—20 ежедневных часовых сеансов развивается устойчивая супрессия HSP90, HSP70 и HIF1 α (рис. 2, В). Наблюдаемый эффект может быть связан с активацией механизмов окислительной и CHIP-зависимой деградации HSP90, HSP70 и HIF1 α [5, 7, 8]. Таким образом, тяжелая гипоксия при многократном курсовом применении вызывает срыв HIF1 α -HSP90-зависимых механизмов выживаемости клетки в условиях дефицита кислорода. Учитывая, что деградация HIF1 α -HSP90 начинается в первые 30—60 мин гипоксии, этот срочный эффект может быть рассмотрен как возможный подход к повреждению малигнизированных клеток, антиоксидантная система которых ослаблена [5]. Действительно, одним из наиболее перспективных направлений в современной онкологии является разработка методов направленной активации в ткани опухоли процессов свободно-радикального окисления, инициирующих быструю деградацию HSP90 [5, 7, 8].

Представленные данные впервые демонстрируют, что в условиях гипоксии разной тяжести и продолжительности сопряженно меняется паттерн срочной экспрессии HSP90 и HIF1 α в КГМ — от индукции в условиях гипоксии слабой (14% O₂, 526 мм рт.ст.) и средней тяжести (10% O₂, 380 мм рт.ст.) до супрессии в условиях тяжелой гипоксии (8% O₂, 290 мм рт.ст.). Впервые показано, что прогрессирующее увеличение содержания HIF1 α в КГМ в условиях курсового применения неповреждающей гипоксии (10% O₂/14% O₂, 1 ч, 20 дней) сопровождается умеренным подавлением экспрессии HSP90 и HSP70, что свидетельствует о возможной отрицательной регуляции со стороны HIF1. Данные исследования динамики экспрессии HIF1 α , HSP90 и HSP70 при однократном и многократном применении неповреждающей гипоксии позволяют заключить, что для индукции HIF1 α -HSP90-зависимых механизмов адаптации необходимо применять короткие курсы (3—8 сут.) часовых гипоксических воздействий средней тяжести. Тяжелая гипоксия при многократном применении вызывает устойчивое подавление экспрессии HSP90, HSP70 и HIF1 α в КГМ и срыв HIF1 α -HSP90-зависимых механизмов адаптации к дефициту кислорода. Таким образом, применение разных режимов гипобарической гипоксии представляет собой потенциальный подход модуляции стабильности комплекса HIF1 α -HSP90 и эффективности HIF1-зависимых механизмов адаптации к дефициту кислорода.

References

1. Semenza G.L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology*. 2009; 24: 97-106.
2. Zhao R., Houry W.A. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem. Cell Biol.* 2005; 83: 703-10.
3. Zhou J., Schmid T., Frank R., Brune B. PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1{alpha} from pVHL-independent degradation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 13506-13.
4. Liu Y.V., Baek J.H., Zhang H., Diez R., Cole R.N., Semenza G.L. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 α and is required for O₂-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 α . *Mol. Cell.* 2007; 25(2): 207-17.
5. Beck R., Dejeans N., Glorieux C., Pedrosa R.C., Vasquez D., Valderrama J.A. et al. Molecular chaperone Hsp90 as a target for oxidant-based anticancer therapies. *Curr Med Chem.* 2011; 18(18): 2816-25.
6. Malyshev I.Ju. Hypoxia and reprogramming of the immune response in tumor development: the central role of macrophages. *Patogenez.* 2011; 3: 44-5. (in Russian)
7. Muller P., Ruckova E., Halada P., Coates P.J., Hrstka R., Lane D.P. et al. C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances. *Oncogene.* 2012; 32: 3101-10.
8. Shih Y., Chun-Hung L. S-Glutathionylation promotes HSP90 degradation under oxidative stress. *The FASEB.* 2015; 29(1). Supplement 717.6.
9. Lukyanova L.D., Germanova Je.L., Kopaladze R.A. Patterns of formation of resistance of the organism under different regimes of hypoxic preconditioning: the role of the hypoxic period and reoxygenation. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2009; 147(4): 380-4. (in Russian)
10. Zhang X., Huang C.J., Nazarian R., Ritchie T., de Vellis J.S., Noble E.P. Isolation of nuclear protein from human brain. *Bio Techniques.* 1997; 22(5): 848-50.
11. Shahbazian F.M., Jacobs M., Laitha A. Rates of protein synthesis in brain and other organs. *Int J Dev Neurosci.* 1987; 5(1): 39-42.
12. Kirova Yu.I. The role of the glutathione system in the regulation of the oxidation-reduction status of the rat cerebral cortex during hypoxia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2014; 4: 40-7. (in Russian)
13. Shurygina L.V., Zlischeva E.I., Kravtsov A.A., Poleshchuk L.A., Abramova N.O. Effect of potassium comenat on antioxidant glutathione system in brain of stressed mice. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2016; 60(2): 20-3. (in Russian)
14. Cummins E.P., Berra E., Comerford K.M., Ginouves A., Fitzgerald K.T., Seeballuck F. et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase- β , giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103: 18154-59.
15. Prodromou C. Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem. J.* 2016; 473: 2439-52.
16. Gorlach A., Bonello S. The cross-talk between NF- κ B and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem. J.* 2008; 412: e17-9.
17. Ammirante M., Rosati A., Gentilella A., Festa M., Petrella A., Marzullo L. et al. The activity of hsp90 alpha promoter is regulated by NF-kappa B transcription factors. *Oncogene.* 2008; 27(8): 1175-8.

18. Lukyanova L.D., Kirova Yu.I. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Frontiers in Neuroscience*. 2015; 9: 1-15.

19. Kirova Yu.I., Lukyanova L.D. Regulatory role of the glutathione system in coupled redox processes of brain adaptation to hypoxia. In: Y. Kawai, A.R. Hargens, P.K. Singal. *Adaptation Biology and Medicine. Current Trends*. Narosa Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, India. 2017; 8: 221-40.

20. Kundrat L., Lynne R. Identification of residues on Hsp70 and Hsp90 ubiquitinated by the co-chaperone CHIP. *J Mol Biol*. 2010; 395(3): 587-94.

21. Shi H. Hypoxia inducible factor 1 as a therapeutic target in ischemic stroke. *Curr Med Chem*. 2009; 16(34): 4593-600.

22. Taylor D.M., Tradewell M.L., Minotti S., Durham H.D. Characterizing the role of Hsp90 in production of heat shock proteins in motor neurons reveals a suppressive effect of wild-type Hsf1. *Cell Stress & Chaperones*. 2007; 12(2): 151-62.

23. Gogate S.S., Fujita N., Skubutyte R., Shapiro I.M., Risbud M.V. TonEBP and HIF coordinate Hsp70 expression in hypoxic nucleus pulposus cells: role of Hsp70 in HIF-1 α degradation. *J Bone Miner Res*. 2012; 27(5): 1106-17.

Сведения об авторах:

Кирова Юлия Игоревна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии ФГБНУ НИИОПП; e-mail: bioenergy@mail.ru

Германова Элита Леонидовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии ФГБНУ НИИОПП