

© Ю.И. Кирова, 2012
УДК 616.152.21:616.831.31:616-003.96:599.323.4

Ю.И. Кирова

Влияние гипоксии на динамику содержания HIF-1 α в коре головного мозга и формирование адаптации у крыс с различной резистентностью к гипоксии

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Гипоксические воздействия в режиме прекодиционирования вызывают в коре головного мозга неустойчивых к гипоксии крыс фазное увеличение экспрессии HIF-1. Показано, что после каждого гипоксического воздействия наблюдается кратковременная фаза срочной экспрессии HIF-1, которая быстро нивелируется в нормоксических условиях. Вторичное увеличение экспрессии HIF-1 развивается через сутки после очередного гипоксического воздействия. Фазность срочной и долгосрочной экспрессии HIF-1 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. У высокоустойчивых животных гипоксические воздействия в режиме прекодиционирования не влияют на экспрессию HIF-1 и формирование адаптации. Тяжелая гипоксия вызывает у двух фенотипов животных подавление экспрессии HIF-1, снижение способности к формированию срочной резистентности и нарушение индукции долговременной адаптации.

Ключевые слова: HIF-1 α , неокортекс, гипоксия, высокоустойчивые и неустойчивые к гипоксии крысы, срочная и долгосрочная адаптация к гипоксии

Yu.I. Kirova

Impact of hypoxia on dynamics of the post-hypoxia HIF-1 α level in neocortex and adaptation forming in rats with different resistance to hypoxia

Institute of general pathology and pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

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 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. In high-resistance rats, hypoxia preconditioning does not influence the HIF-1 α protein expression and the adaptation. Severe hypoxia inhibits the HIF-1 α protein expression in the neocortex of both rat phenotypes, depresses the formation of urgent resistance, and abolishes the induction of long-term adaptation.

Key words: HIF-1 α , neocortex, hypoxia, high-resistance rats, low-resistance rats, urgent and long-term adaptation to hypoxia

Гипоксические воздействия инициируют активацию адаптивных механизмов как на клеточном, так и системном уровне. Главным молекулярным медиатором формирования долговременной адаптации является индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор HIF-1 (hypoxia inducible factor). В настоящее время известно свыше 180 генов, экспрессия которых является HIF-зависимой. Гипоксический транскрипционный фактор координирует пролиферацию, дифферен-

цировку и клеточную выживаемость как на этапе эмбрионального развития, так и в постнатальном периоде. HIF-1 контролирует ангиогенез, эритропоэз, гликолиз, тонус сосудов [6—8].

HIF-1 — гетеродимерный белок, состоящий из двух субъединиц. Индуцибельная HIF-1 субъединица определяет транскрипционную активность и является кислород-регулируемой. В условиях нормоксии HIF-1 α подвергается деградации, инициируемой реакциями гидроксирования. Время ее полураспада в убиквитин-протеасомальной системе составляет не более 5 мин. В условиях гипоксии происходит подавление протеасомальной деградации, создаются усло-

Для корреспонденции: Кирова Юлия Игоревна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биоэнергетики ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: bioenerg@mail.ru

вия для стабилизации HIF-1 α , транслокации из цитоплазмы в ядро, димеризации с конститутивно экспрессируемой HIF-1 β субъединицей. Комплекс HIF-1 связывается с регуляторными последовательностями ДНК — HREs (hypoxia response element) и активирует транскрипцию генов-мишеней. Синтез HIF-1 α , в отличие от деградации, является кислород-независимым процессом, индуцируется факторами роста через тирозинкиназные рецепторы и активацию сигнальных путей MAPK и PI3K [7, 8].

В настоящее время накоплен огромный банк данных о роли HIF-1 в формировании генно-опосредованных ответов клеток на гипоксические воздействия. Однако подавляющее большинство исследований проведены на клеточных культурах и в условиях моделирования жесткой гипоксии (1—2% O₂, многочасовые воздействия). В связи с этим неизученными остаются многие принципиальные вопросы, в том числе:

- 1) имеются ли различия в базовом содержании HIF-1 α у животных с разной чувствительностью к гипоксии;
- 2) какие режимы гипоксии являются оптимальными для экспрессии HIF-1 α ;
- 3) какова динамика содержания HIF-1 α при формировании срочной и долгосрочной адаптации к гипоксии;
- 4) какое значение имеет индивидуальная чувствительность к гипоксии в этих процессах.

Изучению этих вопросов была посвящена представленная работа.

Методика

Работа проведена на двух фенотипах животных: неустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) к гипоксии белых беспородных крысах-самцах, содержащихся в виварии в стандартных условиях [3].

В течение 15 дней животных подвергали воздействию:

а) интервальной нормобарической гипоксии (ИНГ) в режиме прекондиционирования (ежедневные часовые циклы, состоящие из чередования кратковременных (5 мин) периодов дыхания при постоянном нормальном давлении гипоксической газовой смесью, содержащей 10% O₂, сменяющихся дыханием (3 мин) атмосферным воздухом);

б) гипобарической гипоксии в режиме прекондиционирования — подъем в барокамере на высоту 5000 м, 10,5% O₂ и пребывание в этих условиях в течение часа, ГБГ-5000;

в) тяжелой гипобарической гипоксии — подъем в барокамере на высоту 7000 м, 8% O₂ и пребывание в этих условиях в течение часа, ГБГ-7000.

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

Для определения содержания HIF-1 α [5] получали ядерный экстракт КГМ. Белки разделяли в 8% полиакриламидном геле (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли электроолюцией в течение 60 мин. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили 60 мин в PBS, содержащем 0,5% Tween-20 и 5% обезжиренное молоко. Затем Вестерн-блоты инкубировали 14 ч при 4°C в растворе первичных поликлональных антител (Santa Cruz Biotechnology) против HIF-1 α в разведении 1:1000. После отмывки блоты инкубировали 60 мин в растворе вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology) в разведении 1:5000. Детектирование HIF-1 α осуществляли в реакции с ECL-реагентами на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 6,0» с использованием критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия между группами при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Базовое содержание HIF-1 α в КГМ крыс с разной исходной устойчивостью к гипоксии в нормоксических условиях различалось. НУ крысы характеризовались более высоким уровнем HIF-1 α : он в 1,7 раза превышал содержание HIF-1 α в КГМ ВУ животных. Чем выше была толерантность крыс к гипоксии, тем ниже был базовый уровень HIF-1 α в КГМ (таблица). Выявленные различия в базовом содержании HIF-1 α в нормоксических условиях дополняют общую картину метаболических, регуляторных и функциональных отличий, характеризующих два крайних фенотипа животных по их устойчивости к гипоксии [2].

Однократное гипоксическое воздействие в режиме прекондиционирования (одночасовое применение ИНГ и ГБГ-5000) сопровождалось увеличением содержания HIF-1 α в неокортексе НУ животных. Оно было максимальным в первую минуту постгипоксического периода (120—140%) (рис. 1) и являлось, по-видимому, результатом аккумуляции HIF-1 α во время гипоксического воздействия, вы-

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

Время жизни (11 500 м), мин, с	0'40"	1'20"	2'20"	4'20"	8'40"
HIF-1 α , %	173*	174*	158*	116	100

Примечание. * — $p < 0,05$

званной подавлением в этих условиях его кислород-зависимой протеасомальной деградации. В следующие несколько часов постгипоксического периода происходила нормализация уровня HIF-1 α в КГМ, которая сменялась через 24 ч вторичным его увеличением. Последнее могло отражать активацию его кислород-независимого синтеза.

Таким образом, при достаточно мягких режимах гипоксических воздействий в ранний постгипоксический период (1-е сутки) в КГМ НУ крыс наблюдалась активация экспрессии HIF-1 α , которая носила двухфазный характер.

У ВУ крыс, в отличие от НУ, однократное часовое воздействие гипоксии в режиме прекондиционирования не влияло на уровень HIF-1 α в КГМ в первые сутки постгипоксического периода (рис. 1), что говорит о принципиальных отличиях в его экспрессии у данного фенотипа животных.

Однократное применение тяжелой формы гипоксии (ГБГ-7000) приводило у обоих фенотипов животных не к увеличению, а первичному достоверному снижению уровня HIF-1 α в КГМ в ранний постгипоксический период, которое могло достигать 30—40% (рис. 1), что может быть связано с нарастающим в этих условиях энергодефицитом и подавлением синтеза HIF-1 α на этапе трансляции [4]. Снижение экспрессии HIF-1 α в условиях тяжелой гипоксии наблюдали и другие исследователи [9]. В последующие часы происходила его постепенная нормализация вплоть до полного восстановления исходного уровня через сутки.

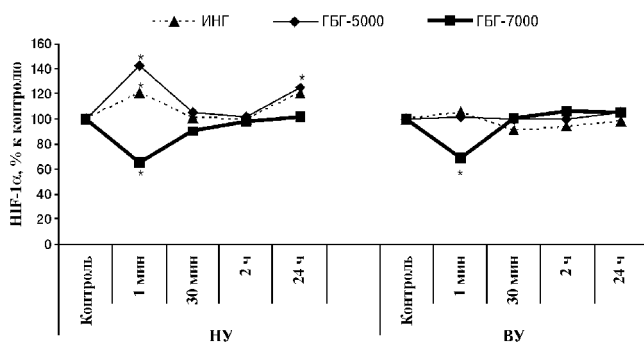


Рис. 1. Динамика содержания HIF-1 α в неокортексе НУ и ВУ крыс в первые сутки постгипоксического периода

При многократном (курсовом) применении гипоксии в режиме прекондиционирования (ИНГ, ГБГ-5000) каждое очередное гипоксическое воздействие приводило, как и в случае однократного применения, к кратковременному увеличению содержания HIF-1 α в КГМ, наблюдаемому сразу по окончании воздействия (через 1 мин), после чего оно снижалось, но оставалось выше того уровня, который предшествовал данному воздействию. Эффект усиления срочной и отсроченной экспрессии возрастал по мере увеличения числа гипоксических воздействий до 3—8. После 15-го гипоксического воздействия она возвращалась к исходным (до адаптации) значениям (рис. 2), что отражало, по-видимому, завершение формирования адаптации.

У ВУ крыс, в отличие от НУ, курсовые гипоксические воздействия в режиме прекондиционирования не влияли на уровень HIF-1 α в КГМ.

При курсовом применении тяжелой гипоксии (ГБГ-7000) срочная индукция HIF-1 α , наблюдаемая через минуты после окончания гипоксического воздействия и характерная для прекондиционирования, отсутствовала. Более того, каждое очередное гипоксическое воздействие сопровождалось примерно одинаковым (25—30%) снижением содержания HIF-1 α в КГМ НУ крыс в раннем постгипоксическом периоде (рис. 3). Через 1 сут. после первых трех гипоксических воздействий наблюдалась нормализация уровня HIF-1 α . Однако при увеличении количества воздействий ГБГ-7000 до 8—15 этого не происходило и содержание HIF-1 α

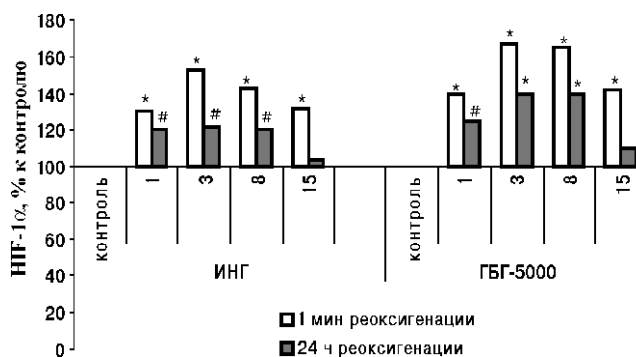


Рис. 2. Динамика содержания HIF-1 α в неокортексе НУ крыс при курсовом применении гипоксии в режиме прекондиционирования

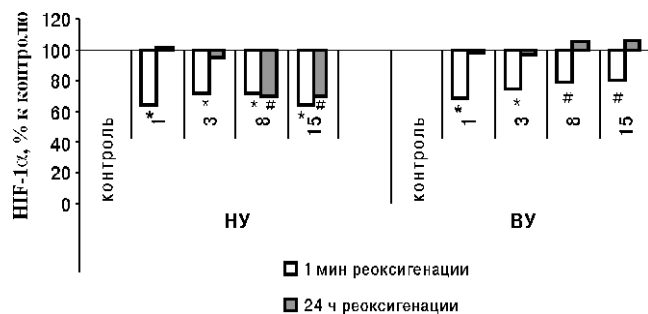


Рис. 3. Динамика содержания HIF-1α в неокортексе НУ и ВУ крыс при курсовом применении тяжелой гипоксии

оставалось устойчиво сниженным через 24 ч после гипоксического воздействия (рис. 3).

У ВУ крыс тяжелая гипоксия, как и в случае с НУ животными, приводила к снижению содержания HIF-1α в КГМ на 20—25%, наблюдаемом сразу после окончания каждого гипоксического воздействия, однако через сутки отмечалась нормализация уровня HIF-1α независимо от числа гипоксических предъявлений (рис. 3).

В связи с полученными данными возникает вопрос, имеется ли связь между наблюдаемыми особенностями экспрессии HIF-1α в ответ на гипоксические воздействия и индивидуальной чувствительностью животных к гипоксии, а также способностью к формированию у них срочной и долгосрочной резистентности, являющихся показателями адаптации.

Известно, что формирование срочной и долгосрочной резистентности происходит только у НУ животных [1, 3]. Нами также было показано, что любое однократное гипоксическое воздействие в режиме прекондиционирования (ИНГ, ГБГ-5000) индуцировало двухфазное увеличение резистентности животных: сразу после окончания гипоксии (срочная резистентность) и через 24 ч (отсроченная резистентность) (рис. 4). Для срочной резистентности было характерно многократное увеличение толерантности НУ крыс к острой гипоксии (в 3—9 раз). Вторичное, отсроченное увеличение толерантности было существенно меньшим (в 1,5—2 раза) и развивалось после периода ее относительной нормализации (рис. 4). Эта фазность полностью совпадала с описанными выше фазными изменениями содержания HIF-1α в 1-е сутки после гипоксического воздействия.

При курсовом применении гипоксических воздействий в режиме прекондиционирования динамика формирования отсроченной резистентности у НУ животных также коррелировала с изменениями содержания HIF-1α в КГМ через 1 сут. после очередного гипоксического воздействия. При увеличении числа воздей-

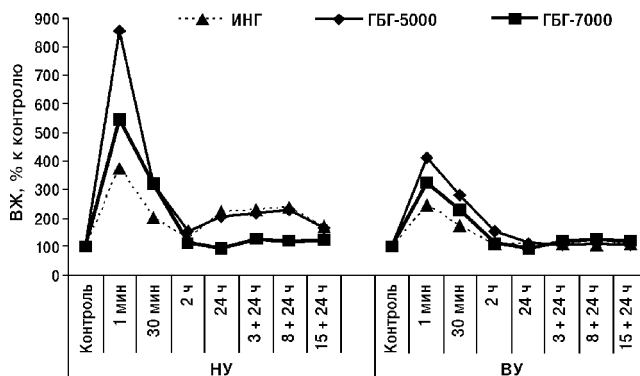


Рис. 4. Динамика резистентности НУ и ВУ крыс в постгипоксическом периоде при курсовом применении разных режимов гипоксии

вий до 8 резистентность нарастала и превышала исходную в 2—2,5 раза. Однако она снижалась после 15-го воздействия, что, видимо, отражало завершение формирования адаптации. Тем не менее, резистентность превышала контрольный уровень в 1,5—2,0 раза (рис. 4).

При курсовом применении тяжелой формы гипоксии (ГБГ-7000) у НУ крыс наблюдалась сниженная, в сравнении с прекондиционированием (ГБГ-5000), индукция срочной резистентности на фоне снижения экспрессии HIF-1α в КГМ в ранний постгипоксический период. Способность к формированию отсроченной резистентности также резко снижалась, а фаза вторичного (через 24 ч) увеличения уровня HIF-1α вообще отсутствовала. Последнее позволяет предполагать нарушение кислород-независимого синтеза HIF-1α в этих условиях.

У ВУ животных степень выраженности срочной резистентности была значимо меньше, в сравнении с НУ. Отсроченная резистентность у них вообще не формировалась (рис. 4).

Таким образом, представленные данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Гипоксические воздействия в режиме прекондиционирования (до 10% O₂) индуцируют у НУ животных фазное увеличение экспрессии HIF-1α в КГМ на фоне такого же фазного формирования срочной и долговременной адаптации к гипоксии. У ВУ животных гипоксические воздействия в режиме прекондиционирования не влияют на экспрессию HIF-1α в КГМ и формирование адаптации;

2. Тяжелая гипоксия (не более 8% O₂) вызывает как у НУ, так и ВУ крыс однонаправленную реакцию подавления срочной экспрессии HIF-1α в КГМ и снижение способности к формированию срочной резистентности к гипоксии. В условиях тяжелой гипоксии долговременная адаптация не формируется у обоих фенотипов животных.

Список литературы

1. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического preconditionирования: роль гипоксического периода и реоксигенации // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2009. — Т. 147, №4. — С. 380—384.

2. Лукьянова Л.Д. Функционально-метаболические особенности животных с различной индивидуальной резистентностью к гипоксии // Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты / Ред. Л.Д. Лукьянова, И.Б. Ушаков. — М.; Воронеж: Истоки, 2004. — С. 156—170.

3. Чернобаева Г.Н., Лукьянова Л.Д. Роль индивидуальной резистентности к гипоксическому фактору при поиске антигипоксантов и оценке эффективности их действия // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. — М., 1989. — С. 160—164.

4. Althausen S., Mengesdorf T., Mies G. et al. Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2alpha, elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice // J. Neurochem. — 2001. — №78. — P. 779—787.

5. Calvert J.W., Cahill J., Yamaguchi-Okada M., Zhang J.H. 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.

6. Semenza G.L., Wang G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation // Mol. Cell. Biol. — 1992. — №12. — P. 5447—5454.

7. Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy // Cancer. — 2003. — №3. — P. 721—732.

8. Semenza G.L. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1 // Physiology. — 2009. — №24. — P. 97—106.

9. Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I. et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia // The FASEB Journal. — 2001. — №15. — P. 2445—2453.

Поступила 27.04.12