

М.В. Сидорова, Е.А. Рыбникова, А.В. Чурилова, В.И. Портниченко, М.О. Самойлов

Влияние различных режимов умеренной гипобарической гипоксии на экспрессию фактора, индуцированного гипоксией, в неокортексе крыс

Иммуногистохимическим методом исследованы изменения экспрессии фактора, индуцированного гипоксией, (HIF-1 α) в неокортексе крыс после воздействий умеренной гипобарической гипоксией (УГГ) в нескольких режимах (одно-, трех- и шестикратные сеансы), отличающихся по эффективности нейропротективного действия. Установлено, что трехкратная экспозиция УГГ, представляющая собой наиболее эффективный протективный режим при применении в качестве гипоксического прекодиционирования, оказывает наиболее выраженный эффект на активность HIF-1, существенно повышая экспрессию его регуляторной α -субъединицы в пирамидальных нейронах неокортекса крыс. Результаты свидетельствуют о важной роли HIF-1 α в механизмах формирования гипоксической толерантности мозга, индуцируемых прекодиционированием трехкратной УГГ.

Ключевые слова: умеренная гипобарическая гипоксия, нейропротективный эффект, фактор, индуцированный гипоксией.

ВВЕДЕНИЕ

Нервные клетки гиппокампа и неокортекса чрезвычайно чувствительны к гипоксии. Даже непродолжительная депривация кислорода вызывает значительные нарушения нейрональных функций, а более длительные гипоксические эпизоды (десятки минут) приводят к структурным нарушениям нейронов и, в конечном итоге, их гибели [4, 14]. С последствиями повреждающего действия гипоксии в настоящее время связывают этиологию и патогенез многих неврологических и нервно-психических заболеваний, в том числе инсульта, деменции, болезни Паркинсона и Альцгеймера [10]. Поэтому проблема повышения резистентности мозга к тяжелым формам гипоксии актуальна. В этом отношении актуальны исследования, активно развивающиеся в последние годы и связанные с разработкой немедикаментозных способов, индуцирующих гипоксическую/ишемическую толерантность мозга. Одним из наиболее эффективных и перспективных

таких способов является гипоксическое прекодиционирование (ГП), основанное на применении повторяющихся сеансов умеренной гипоксии, в частности гипобарической [2, 5, 6, 13]. Установлено, что ГП оказывает выраженное нейропротективное действие, предотвращая структурно-функциональные повреждения нейронов мозга в условиях тяжелой гипоксии [5, 8, 11, 12]. Вызываемое ГП формирование гипоксической/ишемической толерантности нейронов мозга обусловлено индукцией эндогенных геномзависимых процессов адаптации и нейропротекции, затрагивающих все уровни внутриклеточных регуляторных механизмов от активности сигнальных каскадов до экспрессии генома и синтеза проадаптивных белков [6, 9]. Однако до сих пор остается неясным, какой нейрохимический фактор выполняет роль первичного медиатора эффектов ГП, вызывая индукцию проадаптивных процессов. Наиболее вероятным кандидатом на эту роль в настоящее время считается фактор, индуцированный

© М.В. Сидорова, Е.А. Рыбникова, А.В. Чурилова, В.И. Портниченко, М.О. Самойлов

гипоксией, HIF-1, контролирующей клеточные реакции на гипоксию на молекулярном уровне [16].

HIF-1 – это $\alpha\beta$ -гетеродимерный белковый комплекс, связывающийся со специфической последовательностью ДНК (HRE), и регулирующий экспрессию большого числа генов-мишеней. Являясь ключевым звеном внутриклеточного гипоксического сигналинга, HIF-1 осуществляет транскрипционную регуляцию генов, вовлекающихся в базисные молекулярно-клеточные механизмы адаптации, роста, пролиферации и дифференциации клеток [17]. Перечень мишеней HIF-1 включает большое число генов, продуктами которых являются эритропоетин и ферменты, регулирующие механизмы переключения с аэробного метаболизма на гликолиз. Активность HIF-1 зависит от наличия α -субъединицы (HIF-1 α), которая при нормоксии быстро разрушается в кислородзависимых реакциях пролилгидроксилирования и убиквитинации, но стабилизируется с последующей транслокацией в ядро в условиях гипоксии, когда деградирующие ее ферменты инактивируются [1].

HIF-1 считается фактором периферической адаптации, реализующим свое про-адаптивное влияние за счет стимуляции эритропоэза, ангиогенеза, утилизации глюкозы, перестройки процессов транспорта кислорода, тканевого дыхания и термогенеза и др. [3, 7]. Вместе с тем в последнее время уделяется большое внимание возможной нейропротективному значению HIF-1 в мозгу. Обнаружено что у «нокаутных» мышей с дефицитом HIF-1 в мозгу гипоксическая толерантность после ГП не формируется [15], что также согласуется с гипотезой о ключевой роли HIF-1 в реализации нейропротективного действия ГП. Однако необходимы детальные исследования этого вопроса. Целью настоящей работы явился анализ изменений экспрессии HIF-1 α в неокортексе крыс после воздействий умеренной гипобарической гипоксией в нескольких режимах (одно-, трех- и шестикратные сеансы), отличающихся по эффективности нейропротективного действия.

МЕТОДИКА

Опыты проведены на самцах крыс линии Вистар массой 200–250 г. Экспозицию умеренной гипобарической гипоксии проводили в барокамере проточного типа, куда животные помещались на 2 ч, при этом давление в барокамере ступенчато снижали до 360 мм рт.ст. В случае однократного гипоксического воздействия (1УГГ) крыс декапитировали спустя 3 и 24 ч. При применении многократных воздействий соответствующее количество гипоксических сеансов (три и шести) осуществляли с интервалом 24 ч, а декапитацию животных производили через 3 и 24 ч после последнего сеанса гипоксии.

После декапитации крыс мозг быстро извлекали и выделяли коронарные сегменты, содержащие париетальный неокортекс. Образцы фиксировали молекулярным фиксатором FineFix («Milestone», Италия) 24 ч при +4°C. Далее препараты промывали в проточной воде в течение 2 ч и обезвоживали, проводя через этиловые спирты возрастающей концентрации (50, 70, 80, 96 % по 1 ч) и через бутанола (1 ч и ночь). Затем материал проводили через 4 порции ксилола (по 15 мин), 3 порции парафина (по 45 мин) и заливали в парафиновые блоки. Далее при помощи микротомы изготавливали серии чередующихся срезов мозга во фронтальной плоскости толщиной 7 мкм на уровне -2,80 мм от брегмы. Они использовались для количественной иммуноцитохимической оценки содержания белка HIF-1 α в неокортексе (V слой). После стандартных процедур депарафинизации, регидратации и демаскировки антигена, срезы в течение ночи при +4°C инкубировали с первичными поликлональными кроличьими антителами к HIF-1 α («Santa Cruz Biotechnology», Inc, США, разведение 1:100), а далее использовали авидин-биотиновую систему детекции («Vector Laboratories», Inc, Великобритания). Для визуализации реакции использовали диаминобензидин. После обезвоживания и заключения срезов в

желатин проводили количественный анализ иммунореактивности нейронов с использованием системы, состоящей из светового микроскопа Jenaval («Carl Zeiss», Германия), цифровой камеры Baumer CX05c («Baumer Optronic», Германия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением Videotest Master Morphology. На основании оценки оптической плотности клетки разделяли на 2 класса: интенсивно- (класс 1) и слабо- (класс 2) HIF-1 α -иммунопозитивные, анализировали общее число иммунореактивных клеток, и число клеток каждого класса. Результаты статистически обрабатывали с помощью пакетов анализа данных Statistica 7.0 Stat Soft, Inc и Microsoft Excel'2002, использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA ($P < 0,05$). Все результаты представлены в виде среднего арифметического \pm SEM (standard error of the mean) и выражены в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание HIF-1 α оценивали в V слое неокортекса, в котором локализуются крупные пирамиды, являющиеся основными проекционными нейронами неокортекса. Существенных изменений общего числа HIF-1 α -иммунопозитивных нейронов как после однократного, так и многократных (три и шести) воздействий умеренной гипобарической гипоксией не наблюдалось (рис. 1). Однако следует отметить некоторое увеличение числа нейронов, экспрессирующих HIF-1 α , у животных, которым предьявляли трехкратные УГГ, но не другие воздействия.

У контрольных животных в этой области преобладали HIF-1 α -слабопозитивные пирамидальные нейроны (рис. 2). Одно- и шестикратные сеансы УГГ незначительно повышали интенсивность экспрессии HIF-1 α , о чем свидетельствует достоверно возросшее по сравнению с контролем число клеток 1-го класса. Причем шестикратные сеансы УГГ в отличие от однократных индуцировали к 3 ч достоверное (на 400 %) увеличение количест-

ва клеток 1 класса (интенсивнопозитивных). Вместе с тем трехкратное воздействие УГГ оказывало выраженный стимулирующий эффект на экспрессию HIF-1 α . Число клеток 1-го класса возрастало до 1200–1400 % от контрольного уровня (см. рис. 2). Этот эффект развивался уже к 3 часам после последнего сеанса трехкратной УГГ и сохранялся и на 24-часовом сроке.

Ранее в наших исследованиях проводился анализ эффективности использования одно-, трех- и шестикратной УГГ в качестве ГП. Согласно этим данным, однократное прекодирующее воздействие, в отличие от трехкратного, не предотвращает структурно-функциональные повреждения, вызываемые тяжелой гипоксией, а шестикратное ГП оказывает частичный корректирующий эффект [5]. Таким образом, трехкратные сеансы УГГ представляют собой оптимальный режим ГП, а индуцируемые им механизмы по всей видимости отражают эндогенные нейропротективные процессы, обуславливающие формирование гипоксической толерантности мозга. Показано, что выраженная гиперэкспрессия pCREB и NF- κ B65 в неокортексе выявляется после трех-, но не одно- и шестикратных сеансов прекодиционирования. В данной работе установлено, что трехкратная экспозиция УГГ оказывает наиболее выраженный эффект на активность

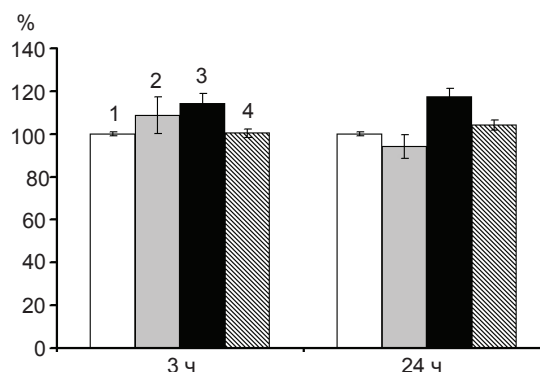


Рис. 1. Влияние сеансов умеренной гипобарической гипоксии (УГГ) различной кратности (одно-, трех-, шести) на количество нейронов неокортекса, экспрессирующих HIF-1 α : 1 – контроль, 2, 3, 4 – одно-, трех-, шестикратная УГГ соответственно

HIF-1, существенно повышая экспрессию его регуляторной α -субъединицы в нейронах неокортекса крыс. Сопоставляя эти результаты с эффективностью режимов ГП, можно сделать заключение, что формирование гипоксической толерантности мозга, индуцируемое трехкратной УГГ, сопровождается оверэкспрессией HIF-1 α .

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-00677, совместным грантом РФФИ № 13-04-90433 и ГФФИ Украины № Ф53.4/038.

М.В.Сидорова, О.О. Рибникова, Г.В. Чурилова, В.І.Портніченко, М.О. Самойлов

ВПЛИВ РІЗНИХ РЕЖИМІВ ПОМІРНОЇ ГІПОБАРИЧНОЇ ГІПОКСІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ ФАКТОРА, ІНДУКОВАНОГО ГІПОКСІЄЮ, У НЕОКОРТЕКСІ ЩУРІВ

Імуногістохімічним методом досліджено зміни експресії гіпоксіїндукційного фактора 1 α (HIF-1 α) у неокортексі щурів після впливів помірної гіпобаричної гіпоксії (ПГГ) в декількох режимах (одно-, трьох-і шестикратні сеанси), що відрізняються за ефективністю нейропротективної дії. Встановлено, що триразова експозиція ПГГ, що являє

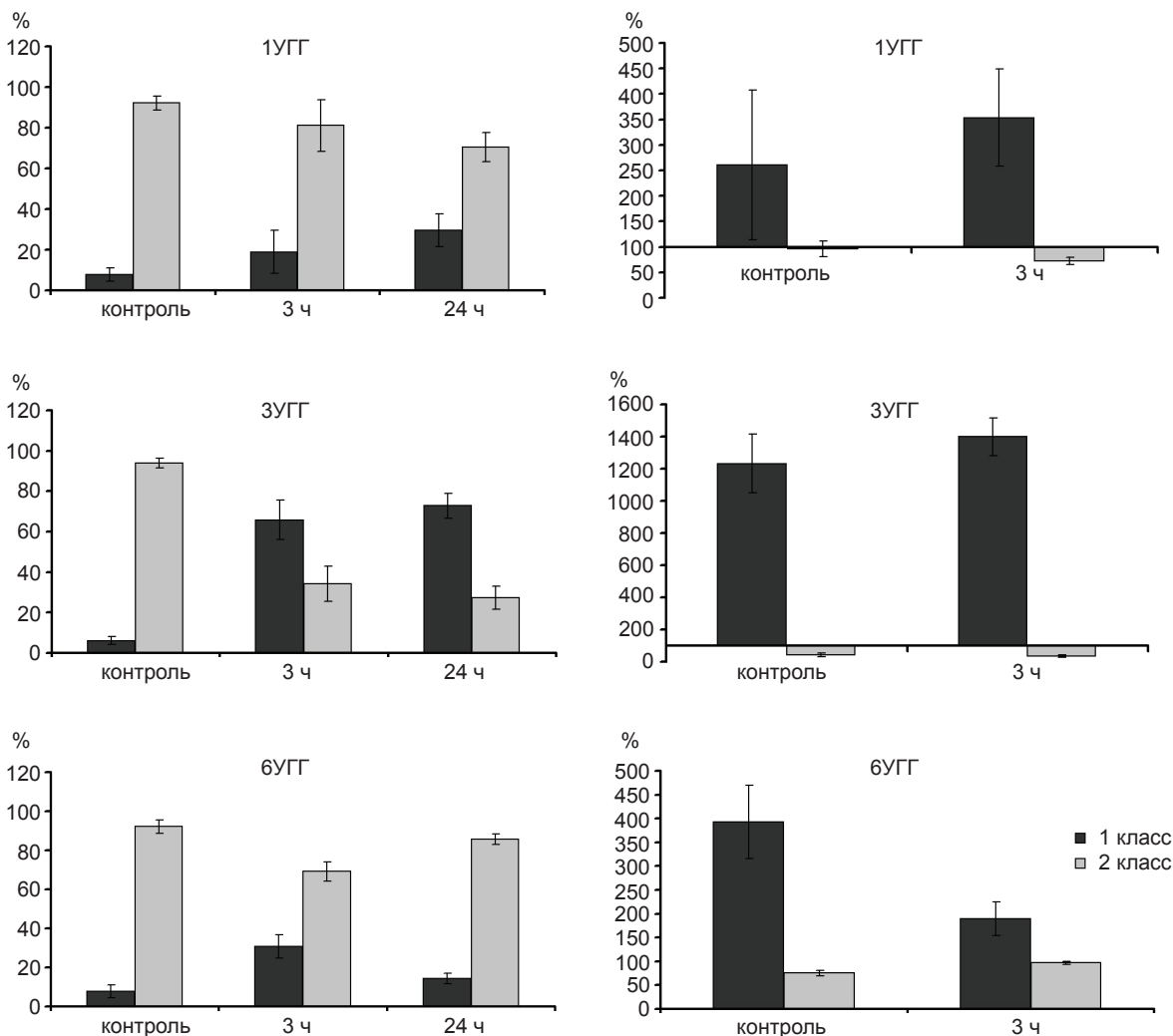


Рис. 2. Эффекты одно- (1УГГ), трех- (3УГГ), шестикратной (6УГГ) на интенсивность экспрессии HIF-1 α , распределение HIF-1 α иммунопозитивных клеток по классам интенсивности. 1-й класс – интенсивно-иммунопозитивные клетки, 2-й класс – слабоиммунопозитивные клетки. Результаты представлены в процентах от общего количества клеток (левая колонка), либо от контрольных значений (правая колонка), в виде среднего \pm ошибка среднего

собой найбільш ефективний протективний режим при застосуванні як гіпоксичне preconditionування, спричинює найбільш виражений ефект на активність HIF-1, істотно підвищуючи експресію його регуляторної α -субодиниці в пірамідальних нейронах неокортексу щурів. Результати свідчать про важливу роль HIF-1 α у механізмах формування гіпоксичної толерантності мозку, індукованих preconditionуванням триразовою ПГГ.

Ключові слова: помірна гіпобарична гіпоксія, нейропротективний ефект, фактор HIF-1 α .

**M.V. Sidorova, E.A. Rybnikova, A.V. Churilova,
V.I. Portnichenko, M.O. Samoilov**

THE IMPACT OF MILD HYPOBARIC HYPOXIA IN DIFFERENT MODES ON EXPRESSION OF HIF-1 α IN RAT NEOCORTEX

Using quantitative immunohistochemistry, modifications of HIF-1 α expression in neocortex of rats exposed to various modes of mild hypobaric hypoxia (MHH) (1, 3 and 6 episodes) differed in their neuroprotective efficacy have been studied. It has been shown that three-trial MHH being the most effective neuroprotective mode when used as a preconditioning produces most considerable changes in HIF-1 by substantial up-regulation of its regulatory α -subunit expression in the rat neocortex. Present findings support the hypothesis on important roles of HIF-1 in the mechanisms of brain hypoxic tolerance induced by the hypoxic preconditioning with three-trial MHH.

Key words: mild hypobaric hypoxia, neuroprotective effect, hypoxia-inducible factor HIF-1.

*Pavlov Institute of Physiology, RAS, St.Petersburg, Russia;
International Centre for Astronomical, Medical and Ecological Research, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции. Обзор // Биол. мембраны. – 2012. – 29, №4. – С.238–253.
2. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Емельянова Т.В., Прут Д.А., Колар Ф.З., Портниченко А.Г., Подкоксенов Ю.К., Халиулин И.Г., Ванг Х., Пей Ж.-М. Гипоксическое preconditionирование, как новый подход к профилактике ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга и сердца // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – 17, №3. – С.27–36.
3. Портниченко В.И., Носарь В.И., Портниченко А.Г., Древицкая Т.И., Сидоренко А.М., Маньковская И.Н. Фазовые изменения энергетического метаболизма при гипоксии // Физиол. журн. – 2012. – 58, №4. – С.3–12.

*ФГБВН Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия;
Международ. центр астроном. и медико-экол. исследований НАН Украины, Киев
E-mail: samoilov@pavlov.infran.ru*

4. Самойлов М.О. Реакции нейронов мозга на гипоксию. – Л : Наука. – 1985. – 190 с.
5. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А. Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды (обзор) // Рос. физиол. журн. им.И.М.Сеченова. – 2012. – 98(1). – С.108–126.
6. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Чурилова А.В. Сигнальные молекулярные и гормональные механизмы протективных эффектов гипоксического preconditionирования // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2012. – №3. – С. 3–10.
7. Серебровская Т.В. Гипоксия-индуцибельный фактор: роль в патофизиологии дыхания. Обзор // Укр. пульмон. журн. – 2005. – № 3. – С. 77–81.
8. Чурилова А.В., Глущенко Т.С., Самойлов М.О. Изменения нейронов гиппокампа и неокортекса крыс под влиянием различных режимов гипобарической гипоксии // Морфология. – 2012. –141 (1). – С.7–11.
9. Obrenovitch T.P. Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia // Physiol. Rev. – 2008. – 88. – P. 211–247.
10. Ogunshola O.O., Antoniou X. Contribution of hypoxia to Alzheimer's disease: is HIF-1 α a mediator of neurodegeneration? // Cell. Mol. Life. Sci. – 2009. – 66, № 22. – P. 3555–563.
11. Rybnikova E, Sitnik N, Gluschenko T, Tjul'kova E and Samoilov M The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats // Brain Res. – 2006. – 1089, № 1. – P.195–202.
12. Rybnikova E., Vataeva L., Tyulkova E., Gluschenko T., Otelin V., Pelto-Huikko M., and Samoilov M. Preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia // Beh. Brain. Res. – 2005. – 160, № 1. – P.107–114.
13. Sharp F.R., Ran R., Lu A., Tang Y., Strauss K.I., Glass T., Ardizzone T., Bernaudin M. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury // NeuroRx. – 2004. – 1, № 1. – P. 26–35.
14. Siesjo B.K., Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1989. – 9, №2. – P.244–252.
15. Taie S., Ono J., Iwanaga Y., Tomita S., Asaga T., Chujo K., Ueki M. Hypoxia-inducible factor-1 α has a key role in hypoxic preconditioning // J. Clin. Neurosci. – 2009. – 16, №8. – P.1056–1060.
16. Webb J.D., Coleman M.L., Pugh C.W. Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing // Cell. Mol. Life Sci. – 2009. – 66(22). – P.3539–3554.
17. Weidemann A., Johnson R.S. Biology of HIF-1 α // Cell Death Differ. – 2008. – 15, № 4. – P.621–627.

Матеріал посту́пів в редакцію 31.04.2013