

І.М. Маньковська, Т.І. Древицька, В.Є. Досенко

## Молекулярно-генетичні дослідження механізмів адаптації до переривчастої гіпоксії

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, відділ по вивченню гіпоксичних станів, відділ загальної та молекулярної патофізіології

**Ключові слова:** гіпоксія • адаптація • HIF

**Б**ільшість адаптаційних процесів при гіпоксії базується на транскрипційній активації генів, які забезпечують енергетичний метаболізм, вазомоторний контроль, еритропоез, ангиогенез тощо. Ключовим регулятором цих відповідей є фактори, індуковані гіпоксією – HIFs. Ці гетеродимерні фактори транскрипції складаються із  $\alpha$ -субодиниць (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  або HIF-3 $\alpha$ ) та  $\beta$ -субодиниць. Якщо рівень  $pO_2$  у цитоплазмі клітин впливає на стабільність білка, субклітинну локалізацію та транскрипційну активність усіх  $\alpha$ -субодиниць HIF, то HIF-1 $\beta$  конститутивно експресується в ядрі та є кисень-нечутливою. Роль HIF-1 $\alpha$  та HIF-1 $\beta$  у клітинних відповідях на гіпоксію більш глибоко розкрита, в той час як дуже мало відомо про органоспецифічну експресію HIF-2 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$ . Відомості про роль усіх субодиниць HIF при адаптації до переривчастої гіпоксії лише починають з'являтися в літературі.

**Мета роботи** – дослідити зміни експресії мРНК HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  в серці, легенях, нирках та литковому м'язі щурів при адаптації до переривчастої гіпоксії, яка моделювалася за допомогою інтервальних гіпоксичних тренувань (ІГТ).

**Матеріали та методи.** Експерименти були проведені на щурах-самцях лінії Вістар (200-220г), рандомізованих у 5 груп (по 5 тварин): 1) нормоксія; 2) гостра нормобарична гіпоксія (дихання газовою сумішшю з 12%  $O_2$ , 120 хв); 3) гостра нормобарична гіпоксія (дихання газовою сумішшю з 7%  $O_2$ , 60 хв); 4) ІГТ (7%  $O_2$  протягом 5 хв з 5-хв нормоксичними інтервалами, 5 циклів щоденно протягом 3 тижнів); 5) ІГТ + гостра гіпоксія, як у 3 групі. Виділення тотальної РНК проводили за допомогою фенол-хлороформеної екстракції (набір "Trizol RNA Prep 100", Росія). кДНК синтезували з 5мкг тотальної РНК методом напівкількісної зворотної транскрипції. Наступний аналіз включав проведення полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням специфічних праймерів та зондів. ПЛР проводили в термоциклері "Applied Biosystems 2700" ("PerkinElmer", США) та системі 7500 Fast Real-time PCR за допомогою Taq-Man®Fast Universal PCR Master Mix і Taq-Man®Gene Expression Assays (Applied Biosystems, UK). Ампліфікати розділяли у 1,6 % агарозному гелі у тріс-боратному буфері рН 8,1 з етидієм бромідом. Візуалізація ампліфікатів генів після горизонтального електрофорезу (170 V протягом 20 хв) проводилася за допомогою транслюмінатору Біоком (Росія), розрахунки

зміни експресії – за допомогою програм ViTran та 7500 Fast System SDS Software.

**Результати та їх обговорення.** Було показано, що за нормоксичних умов експресія мРНК всіх  $\alpha$ -субодиниць HIF була знайдена в усіх досліджуваних тканинах. Відносний найбільший рівень експресії усіх субодиниць HIF спостерігали в легенях та нирках. Встановлено, що рівень експресії мРНК HIF-3 $\alpha$  при гострій гіпоксії (12%  $O_2$ ) по відношенню до контролю, який був прийнятий за умовну одиницю, склав  $12 \pm 0,55$  у серці,  $4,81 \pm 0,19$  у легенях,  $1,57 \pm 0,29$  у м'язі та  $13,16 \pm 0,4$  у нирках. При цьому рівень мРНК HIF-1 $\alpha$  залишався незмінним, а рівень експресії мРНК HIF-2 $\alpha$  мав лише тенденцію до збільшення в усіх тканинах, що досліджувалися. Більш жорсткий режим гострої гіпоксії у третій групі тварин (7%  $O_2$ ) дозволив виявити збільшення експресії мРНК HIF-1 $\alpha$  в легенях майже в 2 рази, а рівень експресії мРНК HIF-3 $\alpha$  у цій тканині зростав у 22,2 рази по відношенню до нормоксичного контролю. Цікавим є той факт, що у нирках при впливі більш жорсткої гіпоксії навпаки спостерігалася менш різке збільшення експресії субодиниці HIF-3 $\alpha$  в порівнянні з даними, отриманими у другій групі – в 3 рази. У щурів, тренуваних за допомогою інтервальної гіпоксії (4 група), були виявлені такі органоспецифічні генетичні реакції: рівень експресії HIF-1 $\alpha$  майже не змінювався, HIF-2 $\alpha$  – зростав у 2 рази у легенях, рівень експресії мРНК HIF-3 $\alpha$  змінювався найбільше – зростав у 5,5 разів у нирках та у 2,3 рази у легенях в порівнянні з контролем. Вплив гострої гіпоксії (5 група) на експресію мРНК субодиниці HIF-3 $\alpha$  у тренуваних щурів відрізнявся від такого у нетренуваних, а саме – у легенях цей рівень знизився майже у 10 разів. Раніше нами було показано, що після ІГТ експресія мРНК HIF-3 $\alpha$  у відповідь на гостру гіпоксію меншого ступеня (12%  $O_2$ ) вірогідно знижувалася в усіх досліджуваних тканинах, крім м'язової.

**Висновки.** За нормоксичних умов експресія мРНК всіх субодиниць HIF була виявлена в усіх досліджуваних тканинах. На відміну від інших  $\alpha$ -субодиниць HIF, суттєві зміни експресії знайдені для мРНК субодиниці - 3 $\alpha$  як при гострій помірній гіпоксії, так і при ІГТ. Адаптація до періодичної гіпоксії знижує реакцію в основному HIF-3 $\alpha$  на вплив гострої гіпоксії. Більш жорсткий гіпоксичний вплив здатний регулювати і інші  $\alpha$ -субодиниці HIF на рівні експресії мРНК органоспецифічним чином.