

УДК 577.29

## ЭФФЕКТЫ ТЯЖЕЛОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И ИНГИБИРОВАНИЯ ИНДУЦИРУЕМОГО ГИПОКСИЕЙ ФАКТОРА HIF-1 НА МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРДЕЧНОЙ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРЫС

© 2019 г. Д.А. Федоров\* \*\*, М.Ю. Фролова\*, И.Е. Красовская\*, Н.В. Кулева\*

\*Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

\*\*Санкт-Петербургский государственный морской технический университет, 190121, Санкт-Петербург, ул. Лоцманская, 3

E-mail: iilhj@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.06.2019 г.

После доработки 02.07.2019 г.

Принята к публикации 12.07.2019 г.

Для исследования молекулярных механизмов повреждения сердечных и скелетных мышц использована модель тяжелой гипобарической гипоксии – трехчасовой сеанс пребывания крыс-самцов линии Wistar массой 200–250 г при давлении 180 мм рт. ст. (5% O<sub>2</sub>). Показано достоверное превышение уровня сердечного биомаркера тропонина I в плазме крови крыс, подвергнутых трехчасовой тяжелой гипоксии по сравнению с контролем, что свидетельствует о повреждении миокарда после сеанса тяжелой гипобарической гипоксии. При этом введение животным ингибитора транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  не оказывало значимого влияния на концентрацию тропонина I в плазме. Напротив, в случае использования малоспецифичного биомаркера миоглобина не было обнаружено значимого увеличения выхода его в кровь после гипоксии по сравнению с контролем. Эксперимент с использованием ингибитора HIF-1 $\alpha$  топотекана показал, что количество миоглобина в плазме крови крыс через сутки после сеанса тяжелой гипобарической гипоксии было достоверно меньше, чем в отсутствие ингибитора. Можно полагать, что блокирование транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  за 10 мин до сеанса тяжелой гипобарической гипоксии уменьшает повреждение скелетных мышц. Обсуждаются механизмы, влияющие на адаптацию сердечной и скелетных мышц к гипоксии.

*Ключевые слова:* гипоксия, миоглобин, тропонин I, топотекан, гипоксия-индуцируемый фактор-1 (альфа), миокард.

DOI: 10.1134/S0006302919050235

Хорошо известно, что у аэробных организмов нарушение снабжения клеток кислородом ведет к нарушению их функционирования, а при полном отсутствии кислорода клетки погибают. Особенно важен кислород для таких специализированных систем, как нервная, сердечно-сосудистая и дыхательная. Подобного рода нарушения наблюдаются также при подъеме на высоту, т.е. при гипобарической гипоксии. Модель гипобарической гипоксии широко используется при изучении молекулярных механизмов повреждения нейронов центральной нервной системы [1]. В ходе эволюции многоклеточных организмов их клетки приобрели способность «чувствовать» недостаточность снабжения кислородом и осуществлять адаптивные изменения в экспрессии генов, которые либо усиливают снабжение кислородом, ли-

бо помогают выживанию в гипоксической среде. Центральную роль в этом процессе играет семейство индуцируемых гипоксией транскрипционных факторов HIF (гипоксия-индуцируемых факторов). Один из белков этого семейства – HIF-1 – изменяет экспрессию генов, контролирующих транспорт глюкозы и гликолиз, что обеспечивает адаптацию клеток к условиям гипоксии, а также обеспечивает повышение экспрессии фактора роста эндотелия сосудов и его рецепторов в ответ на уменьшение содержания кислорода (гипоксию) [2]. HIF-1 также может вносить и неблагоприятный вклад в формирование пост-гипоксических патологий [3,4].

HIF-1 является гетеродимером и состоит из нестабильной альфа-субъединицы (HIF-1 $\alpha$ ) и стабильной бета-субъединицы (HIF-1 $\beta$ ). Димер связывается с ДНК в специфических участках, которые называют элементами, ответственными за гипоксию. В условиях достаточного снабжения

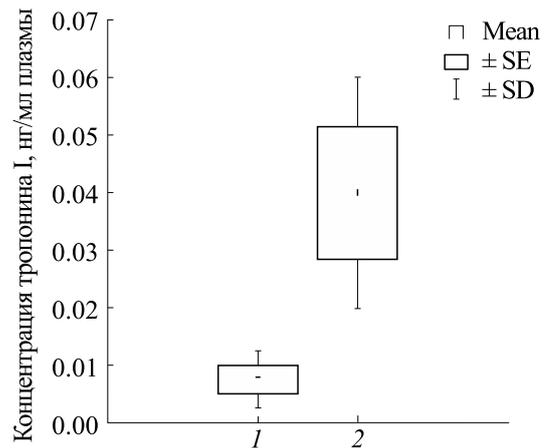
*Сокращения:* HIF – гипоксия-индуцируемый фактор, NO – монооксид азота.

клеток кислородом HIF-1 $\alpha$  гидроксимирируется по первому или по второму высококонсервативным остаткам лизина доменом пролилгидроксилазного семейства белков [5]. В результате образуется связывающий сайт для белка, который является компонентом убиквитин-лигазного комплекса, в результате HIF-1 $\alpha$  полиубиквитинируется и подвергается протеасомной деградации, если кислорода достаточно (состояние нормоксии). При умеренной гипоксии скорость гидроксимирирования HIF-1 $\alpha$  уменьшается, в результате он медленнее подвергается протеасомной деградации, накапливается, димеризуется с HIF-1 $\beta$  и переносится в ядро, где активирует транскрипцию от ста до двухсот генов, в том числе участвующих в эритропоэзе, ангиогенезе, аутофагии и энергетическом метаболизме. Имеется еще одно семейство белков – факторы, ингибирующие HIF-1, – которые действуют подобно пролилгидроксилазному семейству белков, но при более низкой концентрации кислорода [2,6].

В последние годы стало очевидно, что на механизм регуляции активности HIF-1 действуют различные факторы, в том числе активные формы кислорода и окись азота [2]. Поэтому в настоящей работе была предпринята попытка изучить влияние ингибирования транскрипции HIF-1 на повреждение, которое вызывает тяжелая гипобарическая гипоксия в двух типах мышц – сердечных и скелетных.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В представленной работе использована модель тяжелой гипобарической гипоксии – трехчасовой сеанс пребывания крыс-самцов линии Wistar массой 200–250 г при давлении 180 мм рт. ст. (5% O<sub>2</sub>) [7]. Для оценки роли HIF-1 использовали ингибитор топоизомеразы I топотекан [8,9], который в смеси «диметилсульфоксид – 0,09% NaCl» вводили внутривентриально (5 мг/кг массы) за 10 мин до каждого гипоксического сеанса. В качестве инъекционного контроля вводили смесь «диметилсульфоксид – 0,09% NaCl». После сеанса тяжелой гипоксии у крыс были взяты образцы крови для измерения концентрации специфического биомаркера повреждения сердечной мышцы – сердечного тропонина I и менее специфического биомаркера повреждения мышечной ткани – миоглобина, а также суммарной концентрации белка в плазме крови. Плазму крови замораживали при –80°C до момента определения значений биомаркеров (миоглобин, тропонин I) с помощью анализатора иммунохемилюминисценции DXI (Beckman Coulter, США). Тропонин I анализировали с помощью набора Access TnI A 78803, миоглобин – с помощью набора Access Immunoassay Systems Myoglobin 973243, произведенных компанией Beckman Coulter. Общий белок определяли биуретовым методом на биохимическом анализаторе DXC Unicell (Beckman Coulter, США). Концентрацию миогло-



**Рис. 1.** Изменения концентрации тропонина I в плазме крови крыс, не подвергнутых (1) и подвергнутых (2) действию тяжелой гипоксии в течение трех часов, через сутки после сеанса тяжелой гипоксии. По оси ординат – концентрация тропонина I в нг/1 мл плазмы крови.

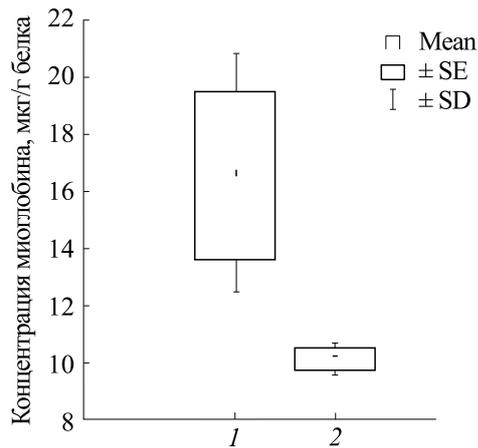
бина относили к концентрации общего белка. Данные по биомаркерам получали в двух независимых сериях исследований, содержащих не более шести животных в каждой серии. Данные обрабатывали методами дисперсионного анализа (использовали критерий достоверности разности средних для малочисленных выборок [10]). Иллюстрации были созданы с помощью программы StatSoft Statistica 6.0.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным, было показано достоверное превышение уровня сердечного белка тропонина I в плазме крови крыс, подвергнутых трехчасовой тяжелой гипоксии (рис. 1), что свидетельствовало о наличии повреждения миокарда. При этом блокирование перед тяжелой гипоксией транскрипции HIF-1 $\alpha$  не оказывало статистически значимого влияния на этот результат (данные не представлены).

Создается впечатление, что HIF-1 не влияет на повреждение миокарда и что, скорее всего, это повреждение связано с активными формами кислорода, образующимися в миокарде во время тяжелой гипоксии и реоксигенации, наступающей после тяжелой гипоксии. Как уже было отмечено в разделе «Введение», активные формы кислорода могут влиять на механизм регуляции активности HIF-1 при гипоксии – гидроксимирирование посредством белков пролилгидроксилазного семейства и семейства факторов, ингибирующих HIF-1 [11,12].

Вторым компонентом, который мог бы повлиять как непосредственно на компоненты кардиомиоцитов, так и на механизм регуляции активности HIF-1, является монооксид азота (NO).



**Рис. 2.** Изменения концентрации миоглобина в плазме крови крыс, подвергнутых действию тяжелой гипоксии в отсутствие (1) и в присутствии топотекана (2), через сутки после сеанса тяжелой гипоксии. По оси ординат — концентрация миоглобина в микрограммах, отнесенная к одному грамму общего белка плазмы крови.

При нормоксии NO ведет к стабилизации индуцированного гипоксией фактора, возможно, путем прямого ингибирования гидроксирования, осуществляемого доменом пролилгидроксилазного семейства белков.

При гипоксии NO ослабляет индукцию HIF-1 $\alpha$  (возможно, за счет уменьшения потребления кислорода митохондриями), повышая таким образом доступность внутриклеточного кислорода [13].

Оксид азота является ключевым компонентом в регуляции гемодинамических параметров, таких как периферическое сопротивление, артериальное давление, сократимость миокарда, частота сокращений сердца, и, как следствие, — перфузирования тканей [14]. При нормоксии основным источником NO являются различные изоформы NO-синтазы. Однако NO-синтаза становится неэффективной при гипоксических условиях, так как активность этого семейства ферментов зависит от кислорода. Нитрит, второй главный источник NO, становится важным именно при гипоксических условиях [15,16]. Оказалось, что именно гипоксия облегчает восстановление нитрита в NO, процесс, катализируемый так называемыми нитритредуктазами, существующими как дополнение к кислород-зависимым NO-синтазам. Образующийся монооксид азота, в свою очередь, служит вазодилататором сосудов мышц и увеличивает снабжение тканей кислородом. [17]

К нитритредуктазам прежде всего относятся миоглобин, содержание которого повышено в сердце, где он наиболее активен в качестве нитритредуктазы [18], гемоглобин, находящийся в эритроцитах, и локализованная там же ксанти-

ноксидоредуктаза. Нитритредуктазной активностью обладают цитоглобин и электрон-транспортная цепь митохондрий, которая проявляет нитритредуктазная активность как при гипоксии, так и при нормоксии. Дополнительные эксперименты с кардиомиоцитами показали, что только генерация NO в митохондриях регулирует уровень циклического гуанозинмонофосфата, опосредующего сократимость кардиомиоцитов [13].

В свете полученных данных об увеличении выхода в кровь сердечного тропонина I при тяжелой гипоксии было бы интересно узнать, повреждается ли какая-либо из нитритредуктаз сердца при тяжелой гипоксии. Известно, что вещества, нарушающие ферментативную активность ксантиноксидоредуктазы, митохондриальное дыхание, блокирующие геммы и тиолы, в той или иной мере уменьшают также степень превращения нитрита в окись азота в условиях гипоксии [14].

После трехчасовой тяжелой гипоксии не было обнаружено достоверно значимых изменений выхода в кровь неспецифического мышечного биомаркера повреждения миоглобина (рис. 2). Это можно объяснить меньшим увеличением содержания активных форм кислорода в скелетных мышцах по сравнению с кардиомиоцитами, так как значительная часть скелетных мышц млекопитающих представлена белыми мышечными волокнами с малым количеством миоглобина и цитохромов, которым свойственен неокислительный тип обмена. В связи с этим при стрессорных условиях, таких как тяжелая гипоксия, количество активных форм кислорода увеличивается не столь значительно, как в сердечной мышце, и они оказываются менее чувствительными к гипоксии [19,20].

Эксперимент с использованием ингибитора HIF-1 $\alpha$  топотекана показал, что концентрация миоглобина (в нг/1 мл плазмы крови крыс) через сутки после сеанса тяжелой гипоксии была в 2,2 раза меньше, чем в отсутствие ингибитора. Данные казались не совсем достоверными из-за большого разброса значений, но после приведения к концентрации общего белка разность средних была уже достоверной (рис. 2). Что касается тропонина I, то разность средних у него оказалась достоверной как для концентрации в нг/1 мл, так и для концентрации в мкг, отнесенной к 1 г общего белка плазмы крови. Таким образом, можно полагать, что блокирование транскрипционного фактора HIF-1 во время тяжелой гипоксии уменьшает повреждение скелетных мышц. При этом следует, вероятно, упомянуть и мнение автора работы [20] о том, что клеточная гипоксия и HIF-1 $\alpha$  не играют главной роли в адаптации скелетных мышц к гипоксии [17]. Поэтому наблюдаемое уменьшение повреждения мышц, возможно, является побочным эффектом использованного ингибитора. Что касается данных о защитном действии блокирования HIF-1 во время тяжелой гипоксии, недавно было показано [4], что

такое блокирование приводит в гиппокампе к отсроченному уменьшению и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, в то же время способствует увеличению количества восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата, нормализации уровня общего глутатиона предотвращению процессов развития состояния окислительного стресса и процессов клеточной гибели. Возможно, что аналогичная ситуация имеет место и в мышечной ткани. В дальнейших исследованиях стоило бы изучить действие введения топотекана на состояние легочной ткани, которая более подвержена повреждению после тяжелой гипоксии.

Таким образом, можно полагать, что тяжелая гипоксия оказывает повреждающее влияние на сердце, а блокирование транскрипционного фактора HIF-1 с использованием ингибитора HIF-1 $\alpha$  топотекана за 10 мин до сеанса тяжелой гипоксии уменьшает повреждение скелетных мышц. Эти результаты стоит рассматривать как предварительные и необходимо подтвердить другими методами.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность О.В. Ветровому за организацию экспериментов с животными по тяжелой гипобарической гипоксии.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. Rybnikova and M. Samoilov, *Front. Neurosci.* **23** (9), 388 (2015).
2. W. Kaelin and P. Rateliffé, *Mol. Cell.* **30**, 393 (2008)
3. Y. Sun, X. Chen, et al., *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 257 (2017).
4. О. В. Ветровой, Автореф. дисс. ... канд. биол. наук (СПбГУ, СПб, 2018).
5. W. Kaelin, *Ann. Rev. Biochem.* **74**, 115 (2005).
6. K. Janke, U. Brockmeier, et al., *J. Cell Sci.* **126** (12), 2629 (2013).
7. E. Rybnikova, N. Sitnik, et al., *Brain Res.* **1089** (1), 195 (2006).
8. H. Ban, Y. Uto, and H. Nakamura, *Expert Opin. Ther. Pat.* **21**, 131 (2011).
9. О. В. Ветровой, Дисс. ... канд. биол. наук (СПбГУ, СПб, 2018).
10. Н. А. Плохинский, в сб. *Актуальные вопросы современной генетики*, под ред. С. И. Алиханяна (Изд-во МГУ, М., 1966), сс. 564–602.
11. J. K. Brunelli, E. Bell, et al., *Cell Metab.* **1**, 409 (2005).
12. K. Mansfield, R. Gury, et al., *Cell Metab.* **1**, 393 (2005).
13. R. Hagen, C. Taylor, et al., *Science* **302**, 1975 (2003).
14. R. Dangel, O. Bernardette, et al., *Sci. Reports* **7**:12092, p. 1 (2017)
15. M. Feelisch, C. Pensenstadler, et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 33927 (2008).
16. Н. В. Кулева и И. В. Красовская, *Цитология* **57** (8): 563 (2015).
17. Н. В. Кулева, Д. А. Федоров и И. Е. Красовская, *Цитология* **60** (1), 5 (2018).
18. Н. В. Кулева и И. Е. Красовская, *Биофизика* **61** (5), 861 (2016).
19. T. Clanton, *J. Appl. Physiol.* **102**, 2379 (2007).
20. T. Chaillou, *Front. Physiol.* **9** (1450), 1 (2018).

## Effects of the Exposure to Severe Hypobaric Hypoxia and Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) on Biomarkers of Cardiac and Skeletal Muscles Injury in the Rat

D.A. Fedorov\* \*\*, M.Yu. Frolova\*, I.E. Krasovskaya\*, and N.V. Kuleva\*

\*St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7, St. Petersburg, 199034 Russia

\*\*St. Petersburg State Marine Technical University, Lotsmanskaya ul. 3, St. Petersburg, 190121 Russia

The aim of this study was to investigate the molecular mechanisms underlying heart and skeletal muscle damage in male Wistar rats weighing from 200 to 250 g at 180 mm Hg exposed to three hours of severe hypobaric hypoxia (5% O<sub>2</sub>) used as a model. Rats exposed to three hours of severe hypoxia presented a significant increase in plasma cardiac troponin I as compared to control, thus reflecting damage to the myocardium after exposure of rats to severe hypobaric hypoxia. At the same time, the administration of the HIF-1 $\alpha$  transcription factor inhibitor into animals did not significantly affect plasma concentration of troponin I. On the contrary, in the case of the use of a none-specific myoglobin biomarker, there was no significant increase in its release into the blood after hypoxia compared with the control. At the same time, an experiment using topotecan as an inhibitor of HIF-1 $\alpha$  showed that the amount of myoglobin in rat blood plasma one day after exposure of rats to severe hypobaric hypoxia was significantly less than in the absence of the inhibitor. Thus, it can be assumed that blocking the transcription factor HIF-1 $\alpha$  for 10 minutes before exposure of animals to severe hypobaric hypoxia reduces damage to skeletal muscles. The mechanisms affecting the adaptation of heart and skeletal muscles to hypoxia are discussed.

*Keywords: hypoxia, myoglobin, troponin I, topotecan, hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1 $\alpha$ ), myocardium*