

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К КИСЛОРОДУ

Обзор

© 2020 А.Н. Вётош^{1,2,3}

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: vjotnn@yahoo.com

² НГУ физической культуры, спорта и здоровья им. П.Ф. Лесгафта, 190121 Санкт-Петербург, Россия

³ СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, 195067 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 09.05.2019

После доработки 29.09.2019

Принята к публикации 20.10.2019

На основании анализа данных литературы описаны молекулярные механизмы рецепции уровня кислорода в различных компартментах клеток животных. Показано, что внутриклеточная сенсорная трансдукция кислорода может осуществляться несколькими способами. Рассмотрены детали функционирования околочембранного и цитоплазматического пулов молекулярных конструкторов клеток в условиях гипоксии. Обсуждаются сведения о роли митохондрий в процессах клеточной чувствительности к уменьшению содержания кислорода. Выявлены подробности взаимного влияния оперативных и хронических внутриклеточных механизмов восприятия отрицательных градиентов концентрации молекулярного кислорода и их связи с реакциями клеточного метаболизма на оксидативный стресс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, калиевые мембранные каналы, HIF.

DOI: 10.31857/S0320972520010042

Кислород – главный детерминант клеточно-метаболизма аэробов. Отдельные клетки и их небольшие группы, инкубируемые в естественных или искусственных условиях, получают жизненно важные ингредиенты путем диффузии. В многоклеточных организмах в распределении атмосферного кислорода участвуют специализированные респираторные и циркуляторные транспортные системы.

Качество распределения кислорода не может не контролироваться на системном, регионарном и клеточном уровне. В последнем случае можно ожидать наличие специальных кислородных клеточных сенсоров или цитоцентрических механизмов, участвующих в управлении клеточным гомеостазом. Наибольшее количество данных о чувствительности клеток к вариациям содержания кислорода получено для клеточных элементов тахитрофных тканей в

условиях перехода от нормоксии к гипоксии *in vitro*.

За последние 30 лет были намечены контуры описания физиологического кислородного гомеостаза клетки. Молекулярную платформу для исследований в этой области обеспечили работы Lopez-Barneo et al. [1] и Semenza et al. [2, 3]. Дальнейшие исследования данной проблемы позволят узнать закономерности пространственной динамики концентрации кислорода внутри клетки, предпочтительные «ворота входа», «воронки утилизации» и возможные «сайты депонирования» O₂.

МИТОХОНДРИИ

Молекулярный кислород является терминальным акцептором электронов в процессах продукции АТФ в митохондриях [4–6]. Эти клеточные органеллы потребляют до 90% кислорода, поступающего к клеткам за счет диффузионного и конвективного массопереноса [5, 7, 8]. Названные обстоятельства многие годы сохраняли за митохондриями статус главной мишени

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ВК_{Ca} – кальций-зависимые калиевые каналы высокой проводимости; CSE – цистатионин-гамма-лиаза; ГИН – фактор, ингибирующий HIF; HO-2 – гемоксигеназа-2; HIF – фактор, индуцированный гипоксией; PHD – пролилгидроксилаза.

в «охоте» исследователей за внутриклеточным кислородным сенсором [6, 9, 10].

Большинство авторов, ставивших себе целью обосновать исходную точку в цепи регулирования внутриклеточного кислородного гомеостаза, по умолчанию искали гипоксический сенсор O_2 . В качестве такового предполагалось обнаружить молекулярный агрегат или процесс, изменяющий свое состояние при уменьшении концентрации молекул кислорода. При этом изменение состояния «предполагаемого сенсора» должно было иметь значимые для функционирования и судьбы клетки последствия.

Ожидаемый на первый взгляд механизм кислородной рецепции предполагали найти в конечных точках поступления кислорода в клетки. Надеялись, что он будет основан на учете запаса АТФ. Если объем этого запаса приблизится к минимально допустимому значению, должен включиться режим «тревоги», и клетка запустит «гипоксический ответ». Вдохновляла умозрительная модель Atkinson [11] и предложенная им формула расчета энергетического заряда клетки. Однако до настоящего времени вышеизложенный механизм обнаружен не был, и в недавнем обзоре Wayra et al. [6] данный вариант сохранения нормального кислородного статуса клетки назван «слишком бедным инженерным решением».

В качестве критики АТФ-зависимого механизма кислородной рецепции можно привести следующие доводы. Во-первых, кроме кислорода для синтеза АТФ требуются различные органические субстраты. Следовательно, количество АТФ отражает не только адекватную доставку кислорода. Во-вторых, совершенно не ясно как отдельная митохондрия и весь митохондриальный пул клетки в целом могут повлиять на диффузионный массоперенос кислорода в экстрацеллюлярной и цитозольной зонах? В-третьих, по данным прямых измерений содержания кислорода в клетках, продукция АТФ сохраняется вплоть до достижения аноксического порога (2 торр, т.е. 2 мм рт. ст.) [12, 13]. Следовательно, ориентация на измерение запаса АТФ не обеспечит детектирование поступления кислорода в диапазоне физиологической гипоксии [6].

Отсутствие положительных ответов на эти вопросы, а также безуспешные 40-летние поиски АТФ-зависимого механизма кислородной внутриклеточной рецепции приводят к выводу о том, что митохондрии, если они и вовлечены в процессы регулирования клеточного кислородного гомеостаза, делают это каким-то иным способом.

Определенный интерес в связи с этим вызывают процессы окисления тиолов перекисью водорода. Однако осторожные в суждениях авторы

обзоров по этой теме считают, что кислородная чувствительность этапов взаимодействия H_2O_2 и тиолсодержащих молекул, в частности глутатиона, глутаредоксинов, тиоредоксинов и пероксиредоксинов является скорее свидетельством оптимизации хрупкого баланса этого альянса, чем кислородной внутриклеточной сенсорной трансдукции [14–16].

Еще один вариант участия митохондрий в формировании «гипоксического ответа» клетки может быть основан на сигнальной роли активных форм кислорода (АФК), продуцируемых группой ферментов цепи окислительного фосфорилирования [4, 5, 17–19]. Давно известно, что при поступлении избытка кислорода в клетки продукция АФК увеличивается [20, 21]. В исследованиях прошлых лет отмечалось уменьшение продукции прооксидантов на фоне гипоксических воздействий [22, 23]. Однако с некоторых пор в работах группы авторов появились данные об увеличении продукции одного из видов АФК — перекиси водорода — митохондриями кардиомиоцитов и гладкомышечных клеток легочной артерии в условиях гипоксии [24–26]. Их выводы основывались на результатах нескольких лабораторий, где различными методами изучали процессы внутриклеточного распределения АФК при пониженном содержании кислорода [27–29].

Экспериментально обосновано, что АФК помимо прооксидантных обладают и регуляторными функциями в широком диапазоне клеточных ответов, включая пролиферацию, дифференцировку, старение клеток, регуляцию транскрипционных факторов и воспалительную реакцию [19, 30, 31]. Было сделано предположение о возможном участии прооксидантов, в частности H_2O_2 , в механизмах регулирования внутриклеточного кислородного гомеостаза [32, 33]. В основу доказательной базы легли результаты прямого измерения динамики концентрации АФК с помощью тиолового редокс-сенсора roGFP в гладкомышечных клетках легочной артерии [34]. В условиях нормоксии roGFP был активирован присутствием молекул перекиси водорода в цитозоле только на 20%, в межмембранном пространстве митохондрий — на 45% и в матриксе тех же органелл — на 70%. При гипоксии активация roGFP в цитозоле повышалась до 35%, в межмембранном пространстве — до 65%, а в матриксе митохондрий она заметно снижалась. Сходные изменения наблюдали [32] на изолированных артериальных гладкомышечных клетках. Это прямое подтверждение увеличения концентрации H_2O_2 в цитозоле при гипоксии. Полученные Wayra et al. [6] результаты нашли подтверждение в работах других авторов [8, 35–37].

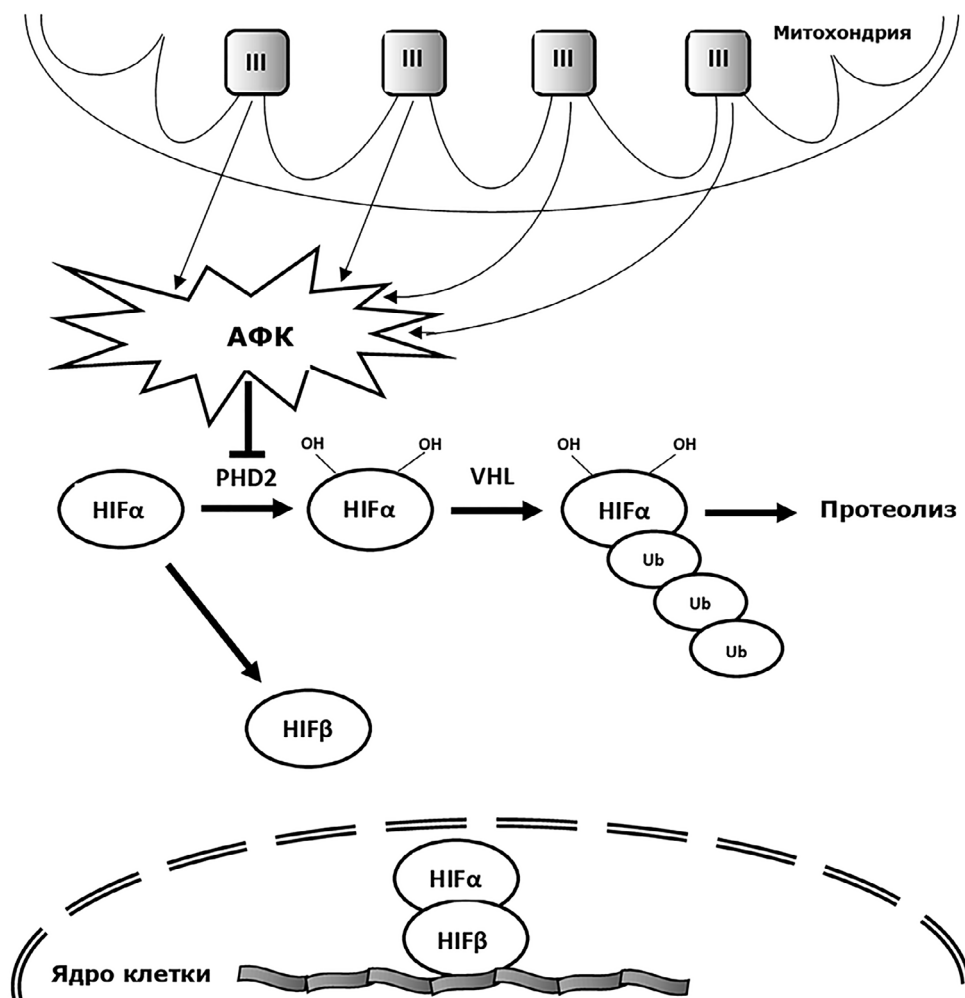


Рис. 1. Ингибирование в цитозоле метаболизма субъединицы HIF- α активными формами кислорода митохондриального генеза, возникающими под влиянием гипоксии: III – митохондриальный комплекс III; АФК – активные формы кислорода; PHD – пролилгидроксилаза; VHL – фактор фон Хиппел–Линдау; HIF – фактор, индуцированный гипоксией; Ub – убиквитин

Недавно были получены доказательства того, что основным источником АФК, оказывающим решающее влияние на кислородный гомеостазис клетки, является комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования [4, 38, 39]. Последовательность событий по вовлечению митохондриальных АФК в организацию клеточного ответа на гипоксию представлена на рис. 1. Под влиянием гипоксии комплексы III дыхательных цепей митохондрий выделяют часть супероксид-анион радикалов в межмембранное пространство [10, 40]. В этом митохондриальном компартменте при участии супероксиддисмутазы названный радикал превращается в H_2O_2 [41, 42]. Далее молекулы перекиси водорода выходят в цитозоль, где оказывают модулирующее влияние на активность фермента пролилгидроксилаза 2 [4, 9, 10].

Семейству ферментов пролилгидроксилаз (PHD) требуется молекулярный кислород как субстрат для деградации фактора, индуцированного гипоксией (HIF), в частности его изоформы HIF- α . Это происходит permanently в нормоксических условиях. Под влиянием гипоксии, т.е. при уменьшении концентрации молекул кислорода в цитозольном окружении PHD2 активность этого фермента снижается, и деградация HIF прекращается. В этом случае молекулы индуцированного гипоксией фактора перемещаются в ядро клетки, испытывающей недостаток кислорода, запускается транскрипция семейства «гипоксических» генов и формируется клеточный гипоксический ответ [43].

Каким же образом увеличение концентрации АФК в цитозоле при гипоксии может приводить к ингибированию активности PHD2 и

стабилизации HIF? По мнению Waура et al. [6] и их единомышленников [44, 45], АФК успевают частично денатурировать молекулы ферментов, что ведет к уменьшению их активности.

Митохондрии эукариотических клеток до недавнего времени оставались наиболее вероятными кандидатами на роль места для кислородных сенсоров [4, 6, 10]. На сегодняшний день собрано достаточное количество доказательств того, что побочные продукты биоэнергетической активности митохондрий — АФК — могут принимать модулирующее участие в цитозольных процессах формирования клеточного ответа на гипоксию [6, 8, 39]. Прооксиданты предстают в этом случае не в качестве O_2 -сенсоров, а скорее в роли O_2 -маркеров. В современных терминах АФК митохондриального генеза являются участниками сигнальных путей, обеспечивающих сохранение кислородного гомеостаза клетки в условиях недостатка кислорода [4, 10]. Можно ожидать, что у этой сигнальной сети более чем один вход.

КИСЛОРОД-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Плазматическая мембрана клетки является первым барьером на пути молекулярного кислорода к сайтам его внутриклеточного использования. По мнению Бенджамин Льюина [46], очень маленькие нейтральные молекулы кислорода легко преодолевают бислойную липидную основу клеточных мембран. Общим свойством всех живых клеток является наличие регулируемого ионного градиента на плазматических мембранах. Отражением динамики этого лабильного процесса является мембранный потенциал, который создается многочисленными классами встроенных в билипидный слой ионных каналов. При формировании мембранного потенциала в клетках животных главным образом участвуют ионы K^+ , Na^+ и Cl^- . Переносящие их каналы испытывают влияние многих факторов (напряженность электрического поля, концентрация ионов Ca^{2+} , H^+ , молекул АТР и т.д.) [47].

После 1988 года в перечень влияний, модулирующих активность мембранных ионных каналов, переносящих K^+ , попал молекулярный кислород. Информация, опубликованная Lopez-Barneo et al. [1], была неожиданной и в последующие годы тщательно проверялась. Уже спустя 9 лет появился первый обзор о влиянии недостатка кислорода на кальций-зависимые калиевые каналы высокой проводимости ($ВК_{Ca}$), который насчитывал 73 публикации по данной теме [48].

Авторы обзора констатировали, что выключение $ВК_{Ca}$ при уменьшении парциального давления кислорода в инкубационном растворе до значений >20 торр не вызывает сомнений. Это оказалось справедливо для широкого класса цитоморфных моделей (гладкомышечных клеток артериальных сосудов, нейронов коры, гиппокампа и черной субстанции, клеток I-го типа каротидных тел, клеток нейроэпителиальных тел в бифуркациях бронхов). Важно отметить, что $ВК_{Ca}$ реагировали на гипоксию как в составе неповрежденной клеточной мембраны целых клеток, так и при регистрации в режиме patch clamp. В обзоре было высказано предположение о том, что и другие типы ионных каналов, возможно, испытывают модулирующее влияние со стороны молекул кислорода.

На втором этапе исследований кислородной чувствительности K^+ каналов специалисты заинтересовались конструкцией этих молекулярных агрегатов. Искали домены, непосредственно отвечающие за сенсорную трансдукцию концентрации молекул кислорода в околоканальном пространстве в процессе исполнительного акта закрытия селективных переносчиков ионов K^+ [49]. Группа кислород-чувствительных калиевых каналов, исследованных авторами, включала три семейства, содержащие более 14 видов [50, 51]. Однако ни в α -, ни в β -субъединицах различных типов калиевых каналов такие кислород-чувствительные домены найдены не были [49, 51].

На третьем этапе появились зачатки так называемой «мембранной гипотезы» [47, 49, 52]. Эта гипотеза формировалась, как попытка ответить на сформулированные к началу XXI века вопросы. Почему только калиевые каналы чувствительны к изменениям концентрации O_2 ? Как они могут длительное время работать без митохондриальной поддержки при регистрации в режиме patch clamp? Являются ли $ВК_{Ca}$ каналы кислородными сенсорами или только эффекторным звеном в реакции на гипоксию? Почему реакция калиевых каналов на уменьшение концентрации кислорода происходит очень быстро?

Различные группы исследователей предположили существование неизвестных белковых ансамблей, прямо или дистантно связанных с кислород-чувствительными калиевыми ионными каналами [47, 49]. Кандидатами в члены этих ансамблей называли глутатион, активированную протеинкиназу, гемоксигеназу-2, NADP(H)-оксидазу и другие белки [47, 53, 54].

Было показано, что $ВК_{Ca}$ тесно связаны с гемоксигеназой-2. В экспериментах, проводимых на клетках I-го типа каротидных тел крыс, ис-

пользуя масс-спектрометрический анализ и ко-иммунопреципитацию, установили тесную ассоциацию молекулярной конструкции кальций-зависимых калиевых каналов высокой проводимости с HO-2 [55]. Катаболизируя геминовые молекулы, гемоксигеназа-2 продуцирует монооксид углерода, биливердин и Fe^{2+} . При нормоксии в качестве кофакторов участвуют NADP(H) и молекулярный кислород. Показано, что монооксид углерода при этом выступает как активатор $ВК_{Ca}$ каналов [56]. При гипоксии, когда кислородный кофактор становится дефицитным, тоническое укрепляющее влияние монооксида углерода на $ВК_{Ca}$ ослабевает, и их проводимость для ионов калия снижается. Молекулы гемоксигеназы-2 выступают, таким образом, в качестве кислородного сенсора при кальций-зависимых калиевых каналах высокой проводимости. Другие группы авторов сумели показать ингибирующее участие H_2S в управлении $ВК_{Ca}$ на фоне гипоксии в клетках I-го типа каротидных тел мышей, крыс и человека [57, 58]. Это заставило включить в объяснительную модель кислородной чувствительности калиевых каналов два внутриклеточных газотрансмиттера: CO и H_2S [52].

Позднее мембранная гипотеза приобрела черты необходимого оформления, если не завершения [51, 59]. Ионные каналы плазматических мембран играют значительную роль в процессах сенсорной трансдукции различной модальности: либо как первичные сенсорные элементы, либо как последующие звенья эффекторной сети [60]. Калиевые каналы клеток I-го типа каротидных тел позвоночных являются примером каналов с эффекторной специализацией. Среди них семейства $Kv3$, $Kv4$, $ВК_{Ca}$ и TASK [50, 52]. Доказано, что проводимость калиевых каналов этих типов зависит от концентрации молекулярного кислорода на поверхности плазматических мембран содержащих их клеток [1, 51]. Открытым оставался вопрос: «Какая часть молекулярного конструкта ионного канала или ассоциированных с функционированием канала сателлитных молекул является кислородным сенсором?».

Авторы мембранной гипотезы Chris Peers и Nanduri Prabhakar считают, что калиевые каналы являются эффекторной частью сигнальной сети в чувствительных к кислороду цитосистемах [49, 51, 52]. Восприимчивыми же к недостатку кислорода следует считать процессы функционирования ассоциированных с калиевыми каналами макромолекул [47, 53, 54]. Среди них HO-2, NADP(H), цистатионин-гамма-лиаза (CSE), гуанилатциклаза (GC), циклический гуанозинмонофосфат (cGMP) и протеинкиназа G (PKG).

Взаимодействие мембранных калиевых каналов различных семейств с ассоциированными белками представлено на рис. 2. Гемоксигеназа-2 осуществляет деградацию гема, превращая его в биливердин, ион двухвалентного железа и монооксид углерода. Кофакторами деградации гема при нормоксии выступают NADP(H) и молекулярный кислород [61]. Вышеназванные процессы происходят в том числе и в гломусных клетках каротидных тел [56, 62].

Молекулы CO оказывают активирующее действие на кальций-зависимые калиевые каналы высокой проводимости [57, 63, 64]. Гипоксия уменьшает продукцию молекул монооксида углерода в каротидных телах. Такое же действие производит блокатор HO-2 цинкпротопорфирин-9 [62]. Эти CO-дефицитные состояния ведут к закрытию $ВК_{Ca}$ [51].

Таким образом, уменьшение концентрации молекулярного кислорода в цитоплазматическом окружении конститутивной HO-2, ассоциированной с $ВК_{Ca}$, понижает ее каталитическую активность. Это приводит к ограничению синтеза внутриклеточного газотрансмиттера – монооксида углерода, который является активатором $ВК_{Ca}$. Дефицит CO в ходе развития гипоксического состояния клетки ведет к закрытию калиевых каналов.

Это нарушает динамику формирования мембранного потенциала гломусных клеток каротидных тел и некоторых других кислородчувствительных клеточных конструктов.

Следовательно, гемоксигеназа-2 клеток I-го типа каротидных тел позвоночных является тем молекулярным внутриклеточным объектом, в котором происходит сенсорная трансдукция концентрации внутриклеточного кислорода в управляющий сигнал для эффекторов – $ВК_{Ca}$. Свою версию мембранной гипотезы авторы считают доказанной [51]. Ее эвристическая сила нашла подтверждение в исследовании на системном уровне. У молодых здоровых испытуемых была отмечена редукция вентиляторного ответа на гипоксию после кратковременной ингаляции избытка монооксида углерода [65].

В дополнение к CO-зависимому механизму модуляции активности калиевых каналов гломусных клеток каротидных тел существует вторая интрацеллюлярная сигнальная цепь. Центральным звеном этой цепи является цистатионин-гамма-лиаза [66, 67]. Данный фермент синтезирует внутриклеточный газотрансмиттер H_2S , который экспрессируется в гломусных клетках каротидных тел позвоночных [51, 57, 68]. В условиях нормоксии синтез молекул сероводорода минимален, но при гипоксии генерация H_2S увеличивается пропорционально на-

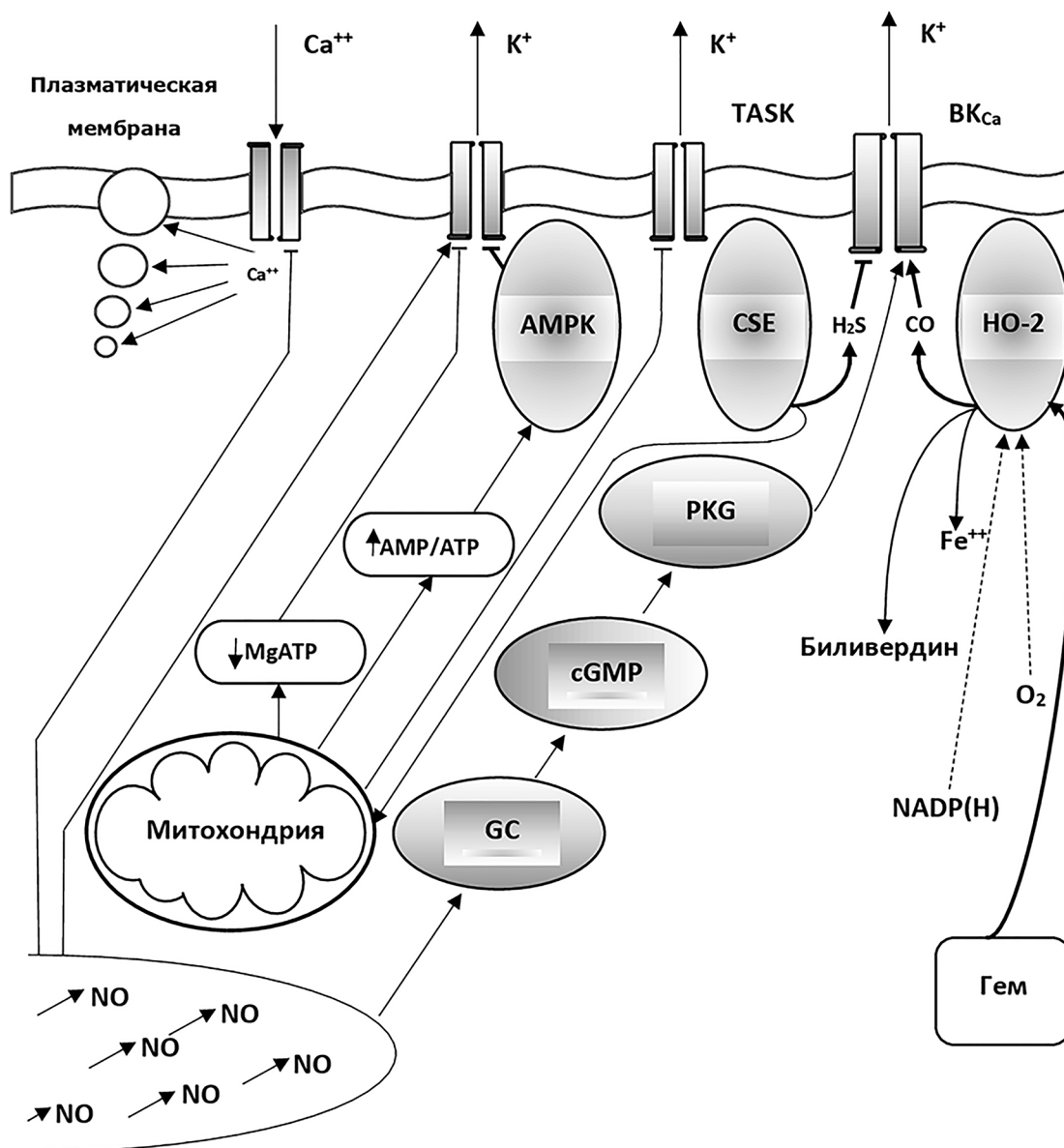


Рис. 2. Взаимодействие мембранных калиевых каналов различных семейств с ассоциированными белками: \bigcirc – ассоциированные с каналами белки; \rightarrow – активирующее действие; \dashv – блокирующее действие; \bigcirc – везикулы с медиатором, продуцируемым гломусными клетками каротидных тел; AMPK – АМФ-активируемая протеинкиназа; CSE – цистатионин-гамма-лиаза; HO-2 – гемоксигеназа-2; PKG – протеинкиназа g; MgATP – активируемая магнием АТРаза; cGMP – циклический гуанилатмонофосфат; GC – гуанилат-циклаза

растанию дефицита кислорода [57, 69]. У нокаутированных по CSE мышей отсутствует увеличение синтеза H₂S в ответ на гипоксию. Блокатор CSE – пропаргил-L-глицин также нивелирует продукцию внутриклеточного сероводорода [59]. Сегодня принято считать, что CSE является главным продуцентом внутриклеточного H₂S в ответ на гипоксию [51]. Искусственное увеличение количества молекул сероводорода в клетках каротидных тел активирует этот орган пропорционально степени воздействия [57, 70].

Совокупность накопленных экспериментальных данных позволяет считать продукт деятельности цистатионин-гамма-лиазы (H₂S) обязательным участником процесса формирования клеточного ответа каротидных тел на гипоксический стимул.

В 2010 году Li et al. [58] первыми выявили влияние избытка внутриклеточного сероводорода на ионные каналы гломусных клеток каротидных тел. Позднее было уточнено, что мишенью для H₂S являются BK_{Ca}, но влияние сероводоро-

да на них отличается от влияния монооксида углерода [59]. Внутриклеточный сероводород провоцирует вход в гломусные клетки ионов кальция [70]. Этот же газотрансмиттер оказывает ингибирующее влияние на калиевые каналы семейства TASK через угнетение процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях гломусных клеток [70, 71]. Однако главной мишенью для продукта каталитической деятельности CSE — сероводорода — в клетках I-го типа каротидных тел являются каналы $ВК_{Ca}$ [59, 72].

Таким образом, в условиях нормоксии фермент CSE малоактивен. На фоне нарастающей внутриклеточной гипоксии его активность растет пропорционально дефициту кислорода, что сопровождается повышением интенсивности генерации H_2S . Этот газотрансмиттер ингибирует активность $ВК_{Ca}$ и косвенно через митохондрии уменьшает проводимость калиевых каналов иных семейств, в частности TASK. Следовательно, цистатионин-гамма-лиаза клеток I-го типа каротидных тел позвоночных является еще одним молекулярным внутриклеточным объектом, в котором происходит сенсорная трансдукция концентрации интрацеллюлярного кислорода в управляющий сигнал для эффекторов — $ВК_{Ca}$. Можно констатировать, что в клетках I-го типа каротидных тел позвоночных имеется более чем один механизм сенсорной трансдукции интрацеллюлярной концентрации молекулярного кислорода в изменении активности калиевых каналов. CO и H_2S газотрансмиттеры действуют на эффекторную часть кислород-чувствительной сигнальной цепи по ходу нарастания гипоксического стимула противоположным образом. При этом концентрация молекул CO уменьшается, и $ВК_{Ca}$ лишаются поддерживающего влияния, а концентрация H_2S растет, что стимулирует закрытие калиевых каналов. Клетка при гипоксии оказывается под надежным двойным контролем.

По мнению авторов последней версии «мембранной гипотезы», третий внутриклеточный газотрансмиттер — NO — также участвует в регулировании внутриклеточного кислородного гомеостаза. Давно известно, что гипоксия уменьшает активность NO-синтазы (NOS), в том числе ее нейрональной изоформы nNOS в гломусных клетках каротидных тел [73]. Последняя не экспрессируется в клетках I-го типа и, по замыслу авторов, попадает в них из окружающих эти клетки эфферентных отростков глоссофаренгиального нерва [51, 73, 74]. Есть данные о том, что искусственное увеличение количества молекул NO в клетках каротидных тел активирует $ВК_{Ca}$ [75]. Однако эти результаты не были подтверждены в иных экспериментальных

условиях [76]. Установлено, что стимулирующее влияние NO на $ВК_{Ca}$ передается от монооксидов азота, проникающих в гломусные клетки через гуанилатциклазу, циклический гуанозинмонофосфат и далее через протеинкиназу g [77, 78].

Давно известно, что самый оперативный (быстрый) клеточный ответ на острую гипоксию свойственен гломусным клеткам каротидных тел. Сегодня не вызывает сомнения тот факт, что в этом ответе участвуют мембранные калиевые каналы нескольких семейств. $ВК_{Ca}$ фигурирует сразу в нескольких сигнальных цепях гипоксического клеточного метаболизма в качестве эффекторного звена. Кислородным сенсором при $ВК_{Ca}$ является гемоксигеназа-2. Наряду с этим хорошо известны молекулярные механизмы цитоплазматического ответа на хроническое гипоксическое воздействие.

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К КИСЛОРОДУ

Каротидные тела являются примером системного «сенсора на кислород» [79, 80]. В свою очередь, гемоксигеназа-2 имеет статус ассоциированного с плазматической мембраной «кислородного сенсора» для гломусных клеток I-го типа каротидных тел [51]. Наряду с этим в цитоплазме всех клеток Metazoa имеется сигнальный пул, центральным звеном которого является HIF — фактор, индуцированный гипоксией [81]. В этом пуле следует искать еще один клеточный сенсор на кислород.

История открытия и исследования HIF-пула кратко изложена в работе Szewczak [82]. Многолетнее изучение регуляторной роли эритропоэтина (Epo) привело к открытию кодирующего его гена [83], а вслед за этим активируемого гипоксией фактора HIF цитоплазматической локализации, запускающего транскрипцию этого гена [2]. Последующий анализ показал, что HIF запускает массивный транскрипционный каскад генов в клетках млекопитающих в ответ на уменьшение доставки кислорода [3, 84].

Состав, структура и функционирование HIFs обсуждаются в многочисленных обзорах [85–87]. Схематически эти данные представлены на рис. 3.

При нормоксии напряжение кислорода в цитоплазме клетки находится в пределах 20–7 торр (рис. 3, а). В таких условиях резидентно присутствующие в клетках молекулы HIF подвергаются протеосомальной деградации. На первом этапе катаболизма HIF на него, в свою очередь, действует молекулярный фактор FIH (фактор ингибирования HIF). Он отщепляет от

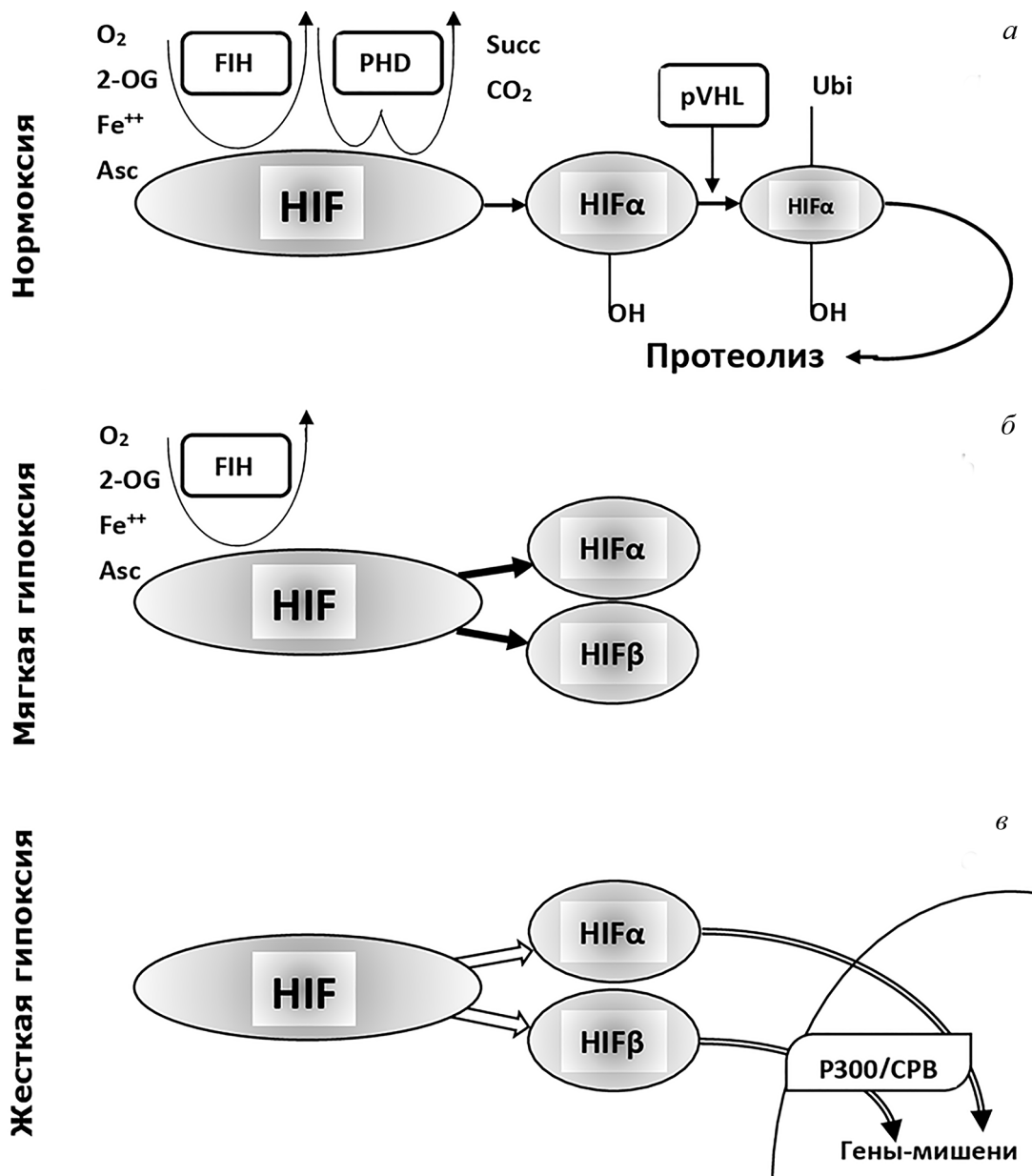


Рис. 3. Схема цитоплазматического кислород-чувствительного пула метаболитов с участием HIF: нормоксия (а), мягкая гипоксия (б) и жесткая гипоксия (в); 2-OG – 2-оксиглутарат; Asc – аскорбиновая кислота; FIH – фактор, ингибирующий HIF; PHD – домен пролилгидроксилазы; Succ – янтарная кислота; pVHL – белок супрессии опухоли фон Хиппел–Линдау; Ubi – убиквитин; P300/CBP – коактиватор транскрипции

HIF аспарагиновый фрагмент. Реакция идет в присутствии достаточного количества кислорода, 2-оксиглутарата, ионов двухвалентного железа и аскорбиновой кислоты [87].

Наряду с этим на начальном этапе протеолиза молекул HIF вступает в действие пролилгидроксилаза, которая присоединяет к двум молекулам пролина в α -субъединице OH-группы. В результате образуется диоксид углерода и янтарная кислота [88]. На следующем этапе деградации HIF- α под влиянием белка супрессии опу-

холи фон Хиппел–Линдау и при участии убиквитина попадает в протеасомы, где подвергается окончательной фрагментации [80, 84].

На исходном этапе развития внутриклеточной мягкой гипоксии при умеренном снижении напряжения кислорода в цитоплазме катаболизм HIF изменяется (рис. 3, б). Выпадает звено с участием пролилгидроксилазы. Полученные промежуточные продукты HIF- α и HIF- β не доходят до протеасом, и окончательный цикл протеолиза не получает завершения [84, 87].

Метаболизм с участием HIF на фоне тяжелой гипоксии представлен на рис. 3, в. В условиях недостатка кислорода начальные этапы протеолиза с участием Fln и RHD становятся невозможными. Более жесткая гипоксия ингибирует гидроксирование аспарагинового фрагмента HIF. HIF- α и HIF- β в этом случае способны совместно с коактиватором транскрипции P300/CBP включать процессы транскрипции генов-мишеней, чья компетенция относится к участию в преодолении кислородного дефицита [80, 84, 85].

По последним оценкам массивный транскрипционный каскад, инициируемый HIF, может затрагивать до 1500 генов [84, 89, 90]. Скорость реагирования клеток на гипоксию с вовлечением метаболического HIF-пула не высока. Самые ранние результаты активирования генома в ответ на внутриклеточный недостаток кислорода проявляются через час [91]. Пик экспрессии генов в условиях хронической внутриклеточной гипоксии наступает через 24 ч [80]. Нокаутированные по HIF мышцы погибают на 10-й день эмбрионального развития, что свидетельствует о востребованности этого механизма регулирования кислородного гомеостаза клеток уже на пренатальном этапе [92].

Анализ изменений метаболизма клеток Metazoa в ответ на уменьшение концентрации кислорода показывает наличие кластера из двух сотен кислород-чувствительных белков, запускающих каскады посттрансляционной модификации других белков. Гидроксилазы – один из важнейших элементов этого кластера. Среди них выделяют пролилгидроксилазы, которые гидроксилируют пролин в белковых молекулах [81, 93].

Домен RHD, ассоциированный с трансляцией молекул HIF в цитоплазме клеток, в условиях клеточной нормоксии постоянно гидроксилирует пролин α -субъединицы этой гетеродимерной молекулы. Гидроксирование осуществляется сначала в позиции P564, а затем в P402, что приводит к кислород-зависимой деградации HIF-1 α [91, 94]. Таким образом, RHD является ближайшим (проксимальным) регулятором активности HIF [9]. Это заставляет нас считать цитоплазматическим сенсором на кислород не HIF, а HIF-гидроксилазы, в том числе RHD [93, 95].

Центральным звеном сигнального пула с участием HIF является семейство индуцированных гипоксией транскрипционных факторов (HIF_s). Этот фактор представляет собой гетеродимерный молекулярный конструктор, состоящий из кислород-чувствительных субъединиц HIF- α и конститутивных субъединиц HIF- β [4, 96]. У высших многоклеточных встречаются три вариации HIF- α субъединиц: HIF-1 α , HIF-2 α и HIF-3 α . Первый экспрессируется во многих, если не всех

клетках млекопитающих, а HIF-2 α и HIF-3 α присутствуют в некоторых видах эндотелия и соединительной ткани [80, 85, 97]. Кроме кислорода на метаболиты HIF-пула действуют АФК, оксид азота, HSP90 и другие молекулы, обладающие сигнальным потенциалом [6, 10]. Рассмотрим детали этих регуляторных процессов.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОСНОВНЫХ МЕХАНИЗМОВ КИСЛОРОДНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТКИ

Митохондриальные, мембранные и цитоплазматические механизмы обеспечения кислородного гомеостаза клетки, являясь активными участниками клеточного метаболизма, не могут быть свободными от взаимного влияния друг на друга [49, 54]. К 2008 году Ward [54] различал три возможных механизма влияния кислород-чувствительных процессов в митохондриях на пластический и энергетический клеточный метаболизм. За прошедшие годы сложилось мнение, что основное влияние митохондрий на цитоплазматические и мембранные механизмы кислородной чувствительности клетки осуществляется главным образом через активные формы кислорода [4, 6, 8, 39].

Метаболический пул цитоплазматических процессов, в которых мастером-регулятором является HIF, представлен на рис. 1 и 3. Активные формы кислорода (H_2O_2) выходят из митохондрий (комплекс III), диффундируют в цитозоле и оказывают супрессирующее влияние на активность фермента пролилгидроксилаза 2 [41, 42]. На фоне развивающейся гипоксии этот процесс усиливается. Как следствие, прекращается деградация HIF. В этом случае разновидности молекул индуцированного гипоксией фактора перемещаются в ядро клетки, испытывающей недостаток кислорода. Запускается транскрипция семейства «гипоксических» генов и формируется клеточный гипоксический ответ [43]. Такого рода механизм не может быть быстрым. Следовательно, реакция на гипоксию при участии HIF-пула оказывается эффективной в случае хронического недостатка кислорода.

Наряду с этим имеет место влияние HIF-пула на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях [80, 98]. Транскрипция гена, кодирующего киназу пируватдегидрогеназы, запускается под влиянием HIF. Эта киназа фосфорилирует субъединицу пируватдегидрогеназы E1 α , тем самым инактивируя этот ферментный комплекс, который конвертирует пируват в ацетил-коэнзим А. Под влиянием HIF это происходит как за счет депривации по глюкозе, так

и путем ограничения использования жирных кислот. В последнем случае HIF-1 индуцирует транскрипцию микроРНК miR210, которая, в свою очередь, уменьшает экспрессию железосеросодержащих каркасных белков ISCU1/2. Как следствие, происходит ингибирование активности цикла трикарбоновых кислот, снижение интенсивности окислительного фосфорилирования и редукция потребления кислорода митохондриями [99, 100]. Таким образом, HIF на фоне развития гипоксии в соответствии с принципом обратной связи оказывает влияние на источник внутриклеточных АФК.

Антиоксидантный потенциал клеток также находится под влиянием HIF-пула. В условиях гипоксии HIF-1 и HIF-2 активируют транскрипцию соответствующих генов, что ведет к запуску в митохондриях процессов дополнительного синтеза глутатиона – базового компонента антиоксидантной системы [101].

Следовательно, HIF-пул и митохондриальный метаболизм клетки сопряжены системой обратных связей, обеспечивающих сохранение в определенных пределах ее кислородного гомеостаза. На сегодняшний день известны два контура обратной связи (прооксидантный и антиоксидантный) между митохондриальными и HIF-пулами клетки, которые балансируют их взаимное влияние. Схематически это представлено на рис. 4.

Взаимодействия митохондриального метаболического пула и мембранно-агрегированных механизмов кислородного гомеостаза клетки исследованы в меньшей степени [4, 52, 102]. В условиях быстро развивающейся гипоксии комплекс I в цепи ферментов окислительного фосфорилирования увеличивает продукцию АФК ($O_2^{\cdot-}$) [4, 103]. Активные формы кислорода, в свою очередь, ингибируют проводимость кальциевых каналов, расположенных на плазматической мембране клетки [4]. Повышение концентрации АФК вблизи внутренней поверхности плазматической мембраны блокирует проводимость ионов калия через TASK каналы [54]. Эта же причина ведет к закрытию кальций-зависимых калиевых каналов высокой проводимости [6]. Таким образом, можно считать доказанным, что АФК в условиях быстро развивающейся гипоксии оказывают тормозное влияние на проводимость кальциевых и калиевых каналов, расположенных поблизости от ассоциированных с этими каналами митондрий [102, 103]. Следовательно, побочные прооксидантные продукты метаболизма митондрий на фоне гипоксии способствуют деполяризации клетки за счет ингибирования нескольких семейств калиевых каналов (рис. 4).

Детальные изменения в мембранно-связанных микродоменах, объединяющих каналы и митохондрии, интенсивно исследуются в настоящее время. Не меньший интерес специалистов вызывают взаимодействия чувствительных к недостатку кислорода мембранных механизмов и HIF-пула цитоплазмы клетки.

Количество экспериментальных исследований взаимного обмена сигналами между кислород-чувствительными каналами плазматической мембраны клетки и HIF-пулом невелико. Нам не удалось найти ни одного обзора на эту тему. В 2006 году Tajima et al. [104] привели доказательства влияния HIF-пула клеток культуры меланомы человека в ходе длительной гипоксии на увеличение проводимости кальций-зависимых калиевых каналов (K_{Ca}). Это происходило под действием избыточной экспрессии HIF-1 α в ответ на недостаток кислорода в среде культивирования. Позднее аналогичный эффект был получен на культурах гладкомышечных клеток легочной артерии крыс для семейства потенциал-зависимых калиевых каналов (K_v) [105] и WEN1-231В клеток мыши для TASK-2 калиевых каналов [106].

Имеются отдельные сведения о том, что в условиях продолжительной гипоксии молекулы HIF-2 α осуществляют репрессию генов, ответственных за синтез β_1 субъединицы W_{Ca} [107].

В последние годы появились данные о прямом влиянии пролилгидроксилаз из HIF-пула на катионные каналы семейства TRP (TRPA1 и TRPV3). В условиях нормоксии пролилгидроксилазы не только направляют HIF на путь протееосомальной деградации, но и ингибируют активность TRPA1. При снижении напряжения кислорода в цитоплазме это ингибирование ослабевает, и в условиях гипоксии происходит его отмена [108, 109].

Полученные данные свидетельствуют о противоположных тенденциях (активирующих и тормозящих) влияния HIF-пула клетки на мембранно-связанные механизмы регулирования клеточного кислородного гомеостаза. Для прояснения приоритетов данного механизма регуляции требуются дальнейшие исследования [110].

Данных об ответном влиянии кислород-чувствительных калиевых каналов плазматической мембраны клеток на HIF-пул найти не удалось. Отсутствие таких данных можно объяснить колоссальной разницей в скорости реагирования ионных каналов (несколько секунд) и метаболизма HIF-пула (десятки минут) на гипоксический стимул. В этом случае медленные процессы могут оказывать эффективное влияние на быстрые, но не наоборот.

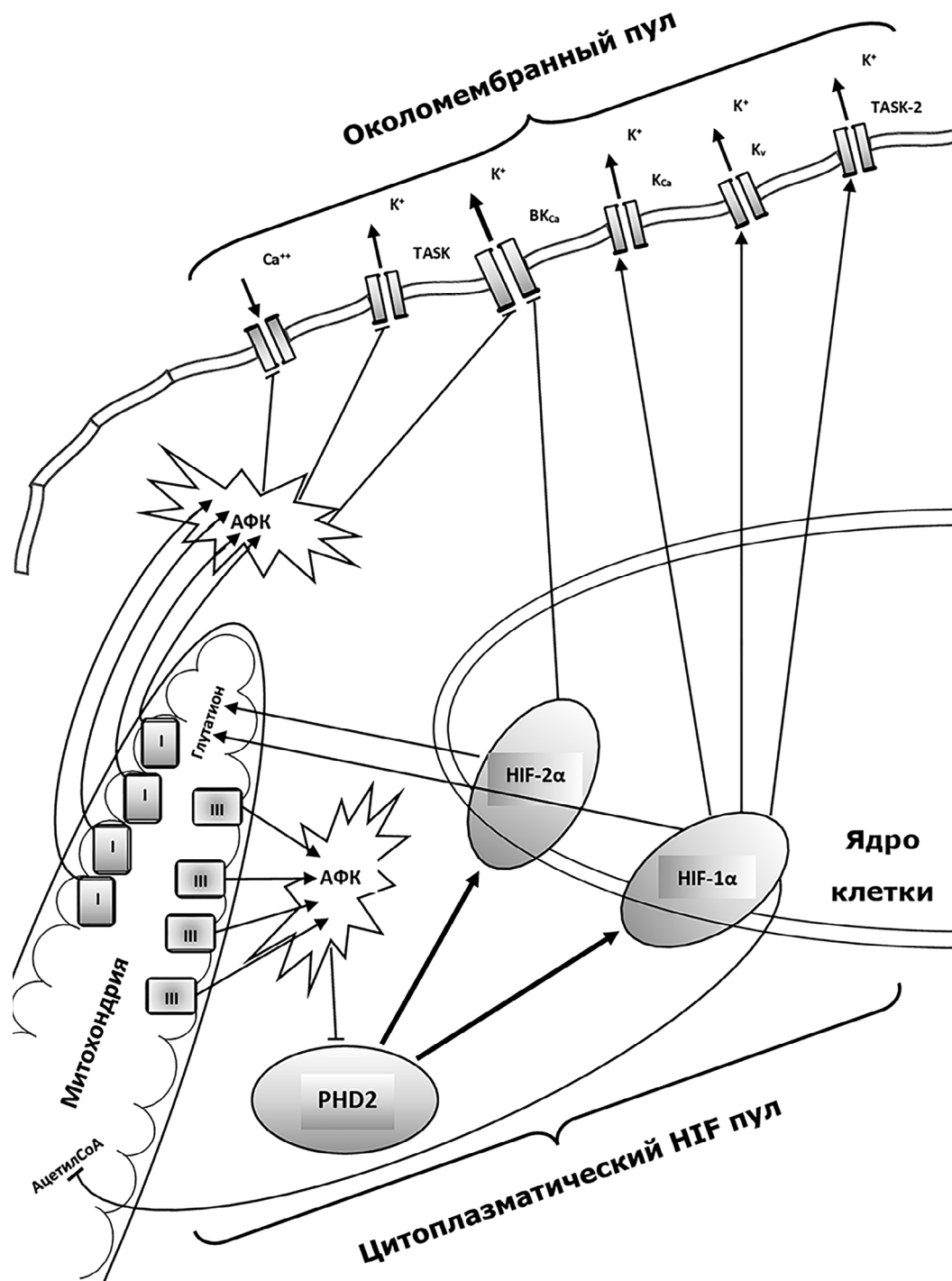


Рис. 4. Сигнальные отношения между метаболическим пулом митохондрий, цитоплазматическим HIF-пулом и около-мембранными механизмами кислородной чувствительности клетки: АФК – активные формы кислорода; I – комплекс I в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; III – комплекс III в цепи ферментов окислительного фосфорилирования; PHD2 – домен пролилгидроксилазы 2

Таким образом, оба основных механизма регулирования кислородного гомеостаза клетки (цитоплазматический и мембранный) в купе с модулирующим влиянием митохондриального метаболизма на фоне действия гипоксических

стимулов различной модальности тесно взаимосвязаны и дополняют друг друга.

Приведенные в обзоре данные позволяют сделать вывод, что клетки Metazoa обладают несколькими способами определения содержа-

ния кислорода в клеточном объеме. На фоне быстроразвивающейся гипоксии детекцию недостатка кислорода осуществляет околембранный пул калиевых каналов с ассоциированными белками. В условиях хронической гипоксии клеточным ответом на уменьшение концентрации кислорода управляет метаболический пул, мастером-регулятором в котором является HIF. Влияние митохондриального метаболизма на эти два полюса кислородно-сенсорной активности ограничиваются модуляцией через АФК. Следует особо отметить, что вышеперечисленные внутриклеточные механизмы вполне успешно реализуют реакции клеток на недостаток кислорода. Избыточные по отношению к норме концентрации окислителя, очевидно, могут так-

же встречаться внутри клеток при экспонировании организма в условиях гипероксии, но их влияние реализуется пока еще недостаточно изученными способами [111–113].

Благодарности. Автор выражает благодарность Л.Б. Буравковой за полезные и конструктивные обсуждения в ходе выполнения работы.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящий обзор не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lopez-Barneo, J., Lopez-Lopez, J., Urena, J., and Gonzalez, C. (1988) Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells, *Science*, **241**, 580–582.
- Semenza, G., and Wang, G. (1992) 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.*, **12**, 5447–5454.
- Semenza, G., Roth, P., Fang, H., and Wang, G. (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1, *J. Biol. Chem.*, **269**, 23757–23763.
- McElroy, G., and Chandel, N. (2017) Mitochondria control acute and chronic responses to hypoxia, *Exp. Cell Res.*, **356**, 217–222, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.034.
- Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. (2010) *Мембранная биоэнергетика*, Изд-во МГУ, Москва.
- Waypa, G., Smith, K., and Schumacker, P. (2016) O₂ sensing, mitochondria and ROS signaling: the fog is lifting, *Mol. Aspects Med.*, **47–48**, 76–89, doi: 10.1016/j.mam.2016.01.002.
- Santore, M., McClintock, D., Lee, V., Budinger, G., and Chandel, N. (2002) Anoxia-induced apoptosis occurs through a mitochondria-dependent pathway in lung epithelial cells, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **282**, L727–L734, doi: 10.1152/ajplung.00281.2001.
- Solaini, G., Baracca, A., Lenaz, G., and Sgarbi, G. (2010) Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1797**, 1171–1177, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.02.011.
- Bell, E., and Chandel, N. (2007) Mitochondrial oxygen sensing: regulation of hypoxia-inducible factor by mitochondrial generated reactive oxygen species, *Essays Biochem.*, **43**, 17–27, doi: 10.1042/BSE0430017.
- Hamanaka, R., and Chandel, N. (2009) Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 894–899, doi: 10.1016/j.ceb.2009.08.005.
- Atkinson, D. (1968) The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers, *Biochemistry*, **7**, 4030–4034.
- Koo, Y., Cao, Y., Kopelman, R., Koo, S., Brasuel, M., and Philbert, M. (2004) Real-time measurements of dissolved oxygen inside live cells by organically modified silicate fluorescent nanosensors, *Anal. Chem.*, **76**, 2498–2505, doi: 10.1021/ac035493f.
- Mik, E., Stap, J., Sinaasappel, M., Beek, J., Aten, J., van Leeuwen, T., and Ince, C. (2006) Mitochondrial PO₂ measured by delayed fluorescence of endogenous protoporphyrin IX, *Nat. Methods*, **3**, 939–945, doi: 10.1038/nmeth940.
- Быстрова М.Ф., Буданова Е.Н. (2007) Перекись водорода и пероксиредоксины в редокс-регуляции внутриклеточной сигнализации, *Биологические мембраны*, **24**, 115–125.
- Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. (2007) Редокс-регуляция клеточных функций, *Биохимия*, **72**, 158–174.
- Hopkins, B.L., and Neumann, C.A. (2019) Redoxins as gatekeepers of the transcriptional oxidative stress response, *Redox Biol.*, **21**, 101–104, doi: 10.1016/j.redox.2019.101104.
- Quinlan, C., Perevoshchikova, I., Hey-Mogensen, M., Orr, A., and Brand, M. (2013) Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates, *Redox Biol.*, **23**, 304–312, doi: 10.1016/j.redox.2013.04.005.
- Goncalves, R., Bunik, V., and Brand, M. (2016) Production of superoxide/hydrogen peroxide by the mitochondrial 2-oxoadipate dehydrogenase complex, *Free Radic. Biol. Med.*, **91**, 247–255, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.020.
- Sena, L., and Chandel, N. (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species, *Mol. Cell*, **48**, 158–167, doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.025.
- McCord, J. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury, *New Engl. J. Med.*, **312**, 159–163, doi: 10.1056/NEJM198501173120305.
- Cross, C., Halliwell, B., Borish, E., Pryor, W., Ames, B., Saul, R., McCord, J., and Harman, D. (1987) Oxygen radicals and human disease, *Ann. Intern. Med.*, **107**, 526–545.
- Archer, S., Peterson, D., Nelson, D., DeMaster, E., Kelly, B., Eaton, J., and Weir, E. (1989) Oxygen radicals and antioxidant enzymes alter pulmonary vascular reactivity in the rat lung, *J. Appl. Physiol.*, **66**, 102–111, doi: 10.1152/jappl.1989.66.1.102.
- Michelakis, E., Archer, S., and Weir, E. (1995) Acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: a model of oxygen sensing, *Physiol. Res.*, **44**, 361–367.
- Chandel, N., McClintock, D., Feliciano, C., Wood, T., Melendez, J., Rodriguez, A., and Schumacker, P. (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing, *J. Biol. Chem.*, **275**, 25130–25138, doi: 10.1074/jbc.M001914200.
- Waypa, G., Marks, J., Mack, M., Boriboun, C., Mungai, P., and Schumacker, P. (2000) Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes, *Circ. Res.*, **91**, 719–726.

26. Guzy, R., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K., Simon, M., Hammerling, U., and Schumacker, P. (2005) Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing, *Cell Metab.*, **1**, 401–408, doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.001.
27. Mansfield, K., Guzy, R., Pan, Y., Young, R., Cash, T., Schumacker, P., and Simon, M. (2005) Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation, *Cell Metab.*, **1**, 393–399, doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.003.
28. Lebuffe, G., Schumacker, P., Shao, Z., Anderson, T., Iwase, H., and Vanden Hoek, T.L. (2003) ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284**, H299–H308, doi: 10.1152/ajpheart.00706.2002.
29. Guzy, R., Mack, M., and Schumacker, P. (2007) Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and gene transcription in yeast, *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 1317–1328, doi: 10.1089/ars.2007.1708.
30. Boveris, A., and Cadenas, E. (2000) Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubiquinone, *IUBMB Life*, **50**, 245–250, doi: 10.1080/0713803732.
31. Sabharwal, S., and Schumacker, P. (2014) Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer*, **14**, 709–721, doi: 10.1038/nrc3803.
32. Waypa, G., Marks, J., Guzy, R., Mungai, P., Schriever, J., Dokic, D., and Schumacher P. (2010) Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells, *Circ. Res.*, **106**, 526–535, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206334.
33. Brand, M. (2016) Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, **100**, 14–31, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001.
34. Remington, S. (2006) Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 714–721, doi: 10.1016/j.sbi.2006.10.001.
35. Liu, H., Colavitti, R., Rovira, I., and Finkel, T. (2005) Redox-dependent transcriptional regulation, *Circ. Res.*, **97**, 967–974, doi: 10.1161/01.RES.0000188210.72062.10.
36. Pan, Y., Mansfield, K., Bertozzi, C., Rudenko, V., Chan, D., Giaccia, A., and Simon, M. (2007) Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity *in vivo* and *in vitro*, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 912–925, doi: 10.1128/MCB.01223-06.
37. Finkel, T. (2012) Signal transduction by mitochondrial oxidants, *J. Biol. Chem.*, **287**, 4434–4440, doi: 10.1074/jbc.R111.271999.
38. Bell, E., and Chandel, N. (2007) Genetics of mitochondrial electron transport chain in regulating oxygen sensing, *Methods Enzymol.*, **435**, 447–461, doi: 10.1016/S0076-6879(07)35023-4.
39. Orr, A., Vargas, L., Turk, C., Baaten, J., Matzen, J., Dardov, V., Attle, S., Li, J., Quackenbush, D., Goncalves, R., Perevoshchikova, I., Petrassi, H., Meeusen, S., Ainscow, E., and Brand, M. (2015) Suppressors of superoxide production from mitochondrial complex III, *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 834–836, doi: 10.1038/nchembio.1910.
40. Sabharwal, S., Waypa, G., Marks, J., and Schumacker, P. (2013) Peroxiredoxin-5 targeted to the mitochondrial intermembrane space attenuates hypoxia-induced reactive oxygen species signaling, *Biochem. J.*, **456**, 337–346, doi: 10.1042/BJ20130740.
41. Murphy, M. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem. J.*, **417**, 1–13, doi: 10.1042/BJ20081386.
42. Murphy, M., Holmgren, A., Larsson, N., Halliwell, B., Chang, C., Kalyanaraman, B., Rhee, S., Thornalley, P., Partridge, L., Gems, D., Nyström, T., Belousov, V., Schumacker, P., and Winterbourn, C. (2011) Unraveling the biological roles of reactive oxygen species, *Cell Metab.*, **13**, 361–366, doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.010.
43. Semenza, G. (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine, *Cell*, **148**, 399–408, doi: 10.1016/j.cell.2012.01.021.
44. Rhee, S., Woo, H., Kil, I., and Bae, S. (2012) Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides, *J. Biol. Chem.*, **287**, 4403–4410, doi: 10.1074/jbc.R111.283432.
45. Chowdhury, R., Flashman, E., Mecinović, J., Kramer, H., Kessler, B., Frapart, Y., Boucher, J., Clifton, I., McDonough, M., and Schofield, C. (2011) Studies on the reaction of nitric oxide with the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain 2 (EGLN1), *J. Mol. Biol.*, **410**, 268–279, doi: 10.1016/j.jmb.2011.04.075.
46. Льюин Б. (2016) В кн. *Клетки по Льюину* (под ред. Кассимерис Л., Лингаппа В., Плоппер Д.), Лаборатория знаний, Москва, с. 26–27.
47. Hoshi, T., and Lahiri, S. (2004) Cell biology. Oxygen sensing: it's a gas! *Cell Biol.*, **306**, 2050–2051, doi: 10.1126/science.1107069.
48. Haddad, G., and Jiang, C. (1997) O₂-sensing mechanisms in excitable cells: role of plasma membrane K⁺ channels, *Annual Rev. Physiol.*, **59**, 23–42, doi: 10.1146/annurev.physiol.59.1.23.
49. Kemp, P., and Peers, C. (2007) Oxygen sensing by ion channels, *Essays Biochem.*, **43**, 77–90, doi: 10.1042/BSE0430077.
50. Platoshyn, O., Brevnova, E., Burg, E., Yu, Y., Remillard, C., and Yuan, J. (2006) Acute hypoxia selectively inhibits KCNA5 channels in pulmonary artery smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **290**, C907–C916, doi: 10.1152/ajpcell.00028.2005.
51. Prabhakar, N.R., and Peers, C. (2014) Gasotransmitter regulation of ion channels: a key step in O₂ sensing by the carotid body, *Physiology (Bethesda)*, **29**, 49–57, doi: 10.1152/physiol.00034.2013.
52. Peers, C., Wyatt, C., and Evans, A. (2010) Mechanisms for acute oxygen sensing in the carotid body, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **174**, 292–298, doi: 10.1016/j.resp.2010.08.010.
53. Kemp, P. (2006) Detecting acute changes in oxygen: will the real sensor please stand up? *Exp. Physiol.*, **91**, 829–834, doi: 10.1113/expphysiol.2006.034587.
54. Ward, J. (2008) Oxygen sensors in context, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 1–14, doi: 10.1016/j.bbabi.2007.10.010.
55. Williams, S., Wootton, P., Mason, H., Bould, J., Iles, D., Riccardi, D., Peers, C., and Kemp, P. (2004) Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel, *Science*, **306**, 2093–2097, doi: 10.1126/science.1105010.
56. Hou, S., Heinemann, S., and Hoshi, T. (2009) Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules, *Physiology (Bethesda)*, **24**, 26–35, doi: 10.1152/physiol.00032.2008.
57. Peng, Y., Nanduri, J., Raghuraman, G., Souvannakitti, D., Gadalla, M., Kumar, G., Snyder, S., and Prabhakar, N. (2010) H₂S mediates O₂ sensing in the carotid body, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10719–10724, doi: 10.1073/pnas.1005866107.
58. Li, Q., Sun, B., Wang, X., Jin, Z., Zhou, Y., Dong, L., Jiang, L., and Rong, W. (2010) A crucial role for hydrogen sulfide in oxygen sensing via modulating large conductance calcium-activated potassium channels, *Antioxid. Redox Signal.*, **12**, 1179–1189, doi: 10.1089/ars.2009.2926.

59. Peers, C. (2015) Acute oxygen sensing— inching ever closer to an elusive mechanism, *Cell Metab.*, **22**, 753–754, doi: 10.1016/j.cmet.2015.10.011.
60. Julius, D., and Nathans, J. (2012) Signaling by sensory receptors, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a005991, doi: 10.1101/cshperspect.a005991.
61. Maines, M. (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **37**, 517–554.
62. Prabhakar, N., Dinerman, J., Agani, F., and Snyder, S. (1995) Carbon monoxide: a role in carotid body chemoreception, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1994–1997.
63. Prabhakar, N. (2012) Carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H₂S) in hypoxic sensing by the carotid body, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **184**, 165–169, doi: 10.1016/j.resp.2012.05.022.
64. Barbé, C., Al-Hashem, F., Conway, A., Dubuis, E., Vandier, C., and Kumar, P. (2002) A possible dual site of action for carbon monoxide-mediated chemoexcitation in the rat carotid body, *J. Physiol.*, **543**, 933–945, doi: 10.1113/jphysiol.2001.015750.
65. Lloyd, B., Cunningham, D., and Goode, R. (2013) in *Arterial Chemoreceptors* (Torrance, R., ed.), Blackwell, Oxford, pp. 145–150.
66. Gadalla, M., and Snyder, S. (2010) Hydrogen sulfide as a gasotransmitter, *J. Neurochem.*, **113**, 14–26, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06580.x.
67. Wang, R. (2012) Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed, *Physiol. Rev.*, **92**, 791–896, doi: 10.1152/physrev.00017.2011.
68. Mkrtchian, S., Kählin, J., Ebberyd, A., Gonzalez, C., Sanchez, D., Balbir, A., Kostuk, E., Shirahata, M., Fagerlund, M., and Eriksson, L. (2012) The human carotid body transcriptome with focus on oxygen sensing and inflammation – a comparative analysis, *J. Physiol.*, **590**, 3807–3819, doi: 10.1113/jphysiol.2012.231084.
69. Makarenko, V., Nanduri, J., Raghuraman, G., Fox, A., Gadalla, M., Kumar, G., Snyder, S., and Prabhakar, N. (2012) Endogenous H₂S is required for hypoxic sensing by carotid body glomus cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **303**, C916–C923, doi: 10.1152/ajpcell.00100.2012.
70. Buckler, K. (2012) Effects of exogenous hydrogen sulphide on calcium signalling, background (TASK) K channel activity and mitochondrial function in chemoreceptor cells, *Pflug. Arch.*, **463**, 743–754, doi: 10.1007/s00424-012-1089-8.
71. Haouzi, P., Bell, H., and Van de Louw, A. (2011) Hypoxia-induced arterial chemoreceptor stimulation and hydrogen sulfide: too much or too little? *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **179**, 97–102, doi: 10.1016/j.resp.2011.09.009.
72. Olson, K., and Whitfield, N. (2010) Hydrogen sulfide and oxygen sensing in the cardiovascular system, *Antioxid. Redox Signal.*, **12**, 1219–1234, doi: 10.1089/ars.2009.2921.
73. Campanucci, V., and Nurse, C. (2007) Autonomic innervation of the carotid body: role in efferent inhibition, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **157**, 83–92, doi: 10.1016/j.resp.2007.01.020.
74. Prabhakar, N., Kumar, G., Chang, C., Agani, F., and Haxhiu, M. (1993) Nitric oxide in the sensory function of the carotid body, *Brain Res.*, **625**, 16–22.
75. Silva, J., and Lewis, D. (2002) Nitric oxide enhances Ca(2+)-dependent K(+) channel activity in rat carotid body cells, *Pflugers Arch.*, **443**, 671–675, doi: 10.1007/s00424-001-0745-1.
76. Summers, B., Overholt, J., and Prabhakar, N. (1999) Nitric oxide inhibits L-type Ca²⁺ current in glomus cells of the rabbit carotid body via a cGMP-independent mechanism, *J. Neurophysiol.*, **81**, 1449–1457, doi: 10.1152/jn.1999.81.4.1449.
77. Li, Y., Zheng, H., Ding, Y., and Schultz, H. (2010) Expression of neuronal nitric oxide synthase in rabbit carotid body glomus cells regulates large-conductance Ca²⁺-activated potassium currents, *J. Neurophysiol.*, **103**, 3027–3033, doi: 10.1152/jn.01138.2009.
78. Campanucci, V., Zhang, M., Vollmer, C., and Nurse, C. (2006) Expression of multiple P2X receptors by glossopharyngeal neurons projecting to rat carotid body O₂-chemoreceptors: role in nitric oxide-mediated efferent inhibition, *J. Neurosci.*, **26**, 9482–9493, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1672-06.2006.
79. Колесникова Е.Э. (2004) Молекулярные механизмы рецепции уровня кислорода, *Нейрофизиология*, **36**, 330–347.
80. Samanta, D., Prabhakar, N., and Semenza, G. (2017) Systems biology of oxygen homeostasis, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, **9**, e1382, doi: 10.1002/wsbm.1382.
81. Semenza, G. (2010) Oxygen homeostasis, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, **2**, 336–361, doi: 10.1002/wsbm.69.
82. Szewczak, L. (2016) Timeline: cellular oxygen sensing, *Cell*, **167**, 286, doi: 10.1016/j.cell.2016.08.065.
83. Lin, F., Suggs, S., Lin, C., Browne, J., Smalling, R., Egrie, J., Chen, K., Fox, G., Martin, F., and Stabinsky, Z. (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7580–7584.
84. Bishop, T., and Ratcliffe, P. (2014) Signaling hypoxia by hypoxia-inducible factor protein hydroxylases: a historical overview and future perspectives, *Hypoxia (Auckl)*, **2**, 197–213, doi: 10.2147/HPS.47598.
85. Gleadle, J. (2009) Review article: How cells sense oxygen: lessons from and for the kidney, *Nephrology (Carlton)*, **1**, 86–93, doi: 10.1111/j.1440-1797.2008.01064.x.
86. Анохина Е.Б., Буравкова Л.Б. (2010) Механизмы регуляции транскрипционного фактора при гипоксии, *Биохимия*, **75**, 185–195.
87. Masson, N., Willam, C., Maxwell, P., and Pugh, C. (2001) Ratcliffe, P. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation, *EMBO J.*, **20**, 5197–5206, doi: 10.1093/emboj/20.18.5197.
88. Maxwell, P., Wiesener, M., Chang, G., Clifford, S., Vaux, E., Cockman, M., Wykoff, C., Pugh, C., Maher, E., and Ratcliffe, P. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis, *Nature*, **399**, 271–275, doi: 10.1038/20459.
89. Semenza, G. (2016) Dynamic regulation of stem cell specification and maintenance by hypoxia-inducible factors, *Mol. Aspects Med.*, **47–48**, 15–23, doi: 10.1016/j.mam.2015.09.004.
90. Prabhakar, N., and Semenza, G. (2016) Regulation of carotid body oxygen sensing by hypoxia-inducible factors, *Pflug. Arch.*, **468**, 71–75, doi: 10.1007/s00424-015-1719-z.
91. Hirsilä, M., Koivunen, P., Günzler, V., Kivirikko, K., and Myllyharju, J. (2003) Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor, *J. Biol. Chem.*, **278**, 30772–30780, doi: 10.1074/jbc.M304982200.
92. Maltepe, E., Schmidt, J., Baunoch, D., Bradfield, C., and Simon, M. (1997) Abnormal Angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT, *Nature*, **386**, 403–407, doi: 10.1038/386403a0.
93. Townley-Tilson, W., Pi, X., and Xie, L. (2015) The role of oxygen sensors, hydroxylases, and HIF in cardiac function and disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 676893, doi: 10.1155/2015/676893.
94. Epstein, A., Gleadle, J., McNeill, L., Hewitson, K., O'Rourke, J., Mole, D., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M., Dhanda, A., Tian, Y., Masson, N., Hamilton, D., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P., Pugh, C.,

- Schofield, C., and Ratcliffe, P. (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation, *Cell*, **107**, 43–54.
95. Coleman, M.L., and Ratcliffe, P.J. (2007) in *Essays in Biochemistry. Oxygen Sensing and Hypoxia-Induced Responses*, (Peers, C., ed.), Portland Press, London, pp. 1–15.
96. Тренделева Т.А., Аливердиева Д.А., Звягильская Р.А. (2014) Механизмы определения низкого уровня кислорода у млекопитающих и дрожжей и их адаптационные ответы, *Биохимия*, **79**, 944–956.
97. Погодина М.В., Буравкова Л.Б. (2015) Особенности экспрессии HIF-1 α в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках при гипоксии, *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **159**, 333–335.
98. Ivan, M., and Kaelin, W.G. Jr., (2017) The EGLN-HIF O₂-sensing system: multiple inputs and feedbacks, *Mol. Cell*, **66**, 772–779, doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.002.
99. Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G., and Dang, C. (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia, *Cell Metab.*, **3**, 177–1785, doi: 10.1016/j.cmet.2006.02.002.
100. Goda N., and Kanai M. (2012) Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism, *Int. J. Hematol.*, **95**, 457–463, doi: 10.1007/s12185-012-1069-y.
101. Lu, H., Samanta, D., Xiang, L., Zhang, H., Hu, H., Chen, I., Bullen, J., and Semenza, G. (2015) Chemotherapy triggers HIF-1-dependent glutathione synthesis and copper chelation that induces the breast cancer stem cell phenotype, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E4600–E4609, doi: 10.1073/pnas.1513433112.
102. Gao, L., González-Rodríguez, P., Ortega-Sáenz, P., and López-Barneo, J. (2017) Redox signaling in acute oxygen sensing, *Redox Biol.*, **12**, 908–915, doi: 10.1016/j.redox.2017.04.033.
103. Fernández-Agüera, M., Gao, L., González-Rodríguez, P., Pintado, C., Arias-Mayenco, I., García-Flores, P., García-Pergañeda, A., Pascual, A., Ortega-Sáenz, P., and López-Barneo, J. (2015) Oxygen sensing by arterial chemoreceptors depends on mitochondrial complex I signaling, *Cell Metab.*, **22**, 825–837, doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.004.
104. Tajima, N., Schönherr, K., Niedling, S., Kaatz, M., Kanno, H., Schönherr, R., and Heinemann, S. (2006) Ca²⁺-activated K⁺ channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1 α and the von Hippel-Lindau protein, *J. Physiol.*, **571**, 349–359, doi: 10.1113/jphysiol.2005.096818.
105. Dong, Q., Zhao, N., Xia, C., Du, L., Fu, X., and Du, Y. (2012) Hypoxia induces voltage-gated K⁺ (Kv) channel expression in pulmonary arterial smooth muscle cells through hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), *Bosn. J. Basic Med. Sci.*, **12**, 158–163, doi: 10.17305/bjms.2012.2463.
106. Shin, D., Lin, H., Zheng, H., Kim, K., Kim, J., Chun, Y., Park, J., Nam, J., Kim, W., Zhang, Y., and Kim, S. (2014) HIF-1 α -mediated upregulation of TASK-2 K⁺ channels augments Ca²⁺ signaling in mouse B cells under hypoxia, *J. Immunol.*, **193**, 4924–4933, doi: 10.4049/jimmunol.1301829.
107. Bautista, L., Castro, M., López-Barneo, J., and Castellano, A. (2009) Hypoxia inducible factor-2 α stabilization and maxi-K⁺ channel beta1-subunit gene repression by hypoxia in cardiac myocytes: role in preconditioning, *Circ. Res.*, **104**, 1364–1372, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.190645.
108. Takahashi, N., Kuwaki, T., Kiyonaka, S., Numata, T., Kozai, D., Mizuno, Y., Yamamoto, S., Naito, S., Knevels, E., Carmeliet, P., Oqa, T., Kaneko, S., Suqa, S., Nokami, T., Yoshida, J., and Mori, Y. (2011) TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 701–711, doi: 10.1038/nchembio.640.
109. Nagarajan, Y., Rychkov, G., and Peet, D. (2017) Modulation of TRP channel activity by hydroxylation and its therapeutic potential, *Pharmaceuticals (Basel)*, **10**, 1–8, doi: 10.3390/ph10020035.
110. Semenza, G., and Prabhakar, N. (2018) The role of hypoxia-inducible factors in carotid body (patho) physiology, *J. Physiol.*, **596**, 2977–2983, doi: 10.1113/JP275696.
111. Macdonald, A., and Vjotosh, A. (1999) Patch-clamp recording of BK_{Ca} channels in hyperbaric oxygen, *J. Physiol.*, **518**, 111P–112P.
112. Pokorski, M., Takeda, K., and Okada, Y. (2016) Oxygen sensing mechanisms: a physiological penumbra, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **952**, 1–8, doi: 10.1007/5584_2016_67.
113. Mori, Y., Takahashi, N., Kurokawa, T., and Kiyonaka, S. (2017) TRP channels in oxygen physiology: distinctive functional properties and roles of TRPA1 in O₂ sensing, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **93**, 464–482, doi: 10.2183/pjab.93.028.

INTRACELLULAR MECHANISMS OF OXYGEN SENSING

Review

A. N. Vjotosh^{1,2,3}

¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
194223 St. Petersburg, Russia; E-mail: vjotnn@yahoo.com

² Lesgaft National State University of Physical Education, Sport and Health, 190121 St. Petersburg, Russia

³ Mechnikov North-Western State Medical University, 195067 St. Petersburg, Russia

Received May 9, 2019

Revised September 29, 2019

Accepted October 20, 2019

Based on the analysis of literature data, molecular mechanisms for oxygen sensing in various compartments of animal cells are postulated. Several ways for intracellular sensory oxygen transduction are suggested. Functioning of the near-membrane and cytoplasmic pools of molecular constructs of cells under hypoxia is considered. Role of mitochondria in cell sensitivity toward a decrease in oxygen content is discussed. Interrelationship of the operational and chronic intracellular mechanisms of perception of negative gradients of molecular oxygen concentration, as well as their relationship with cell response to oxidative stress, is revealed.

Keywords: mitochondria, potassium membrane channels, HIF