

## СОДЕРЖАНИЕ И АКТИВНОСТЬ ГИПОКСИЯ-ИНДУЦИРУЕМОГО ФАКТОРА HIF1 $\alpha$ УВЕЛИЧЕНЫ В ГИППОКАМПЕ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС, ПЕРЕЖИВШИХ ПРЕНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ НА 14–16 СУТКИ ЭМБРИОГЕНЕЗА

© 2020 г. О. В. Ветровой<sup>1,2,\*</sup>, П. П. Нибирицкий<sup>3</sup>, Е. И. Тюлькова<sup>1</sup>, Е. А. Рыбникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория регуляции функций нейронов мозга, ФГБУН Институт физиологии  
им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Кафедра биохимии, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр,  
ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Поступила в редакцию 14.03.2020 г.

После доработки 08.04.2020 г.

Принята к публикации 17.04.2020 г.

Методами вестерн блот и количественной ПЦР в реальном времени изучали содержание регуляторной альфа субъединицы гипоксия-индуцируемого фактора-1 (HIF1 $\alpha$ ) и количество мРНК регулируемых HIF1 генов лактатдегидрогеназы А (*ldha*) и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (*gbpd*) в гиппокампе 1-дневных крысят, матери которых подвергались трем сеансам тяжелой повреждающей гипоксии на 14–16 сут беременности. Пренатальная гипоксия вызывает устойчивое увеличение содержания HIF1 $\alpha$ , а также ведет к увеличению количества мРНК *ldha* и уменьшению количества мРНК *gbpd*. Результаты свидетельствуют о том, что стимуляция опосредованных гипоксией перестроек метаболизма гиппокампа в результате пренатальной гипоксии, очевидно, является устойчивой, что может вызывать нарушения энергетического метаболизма мозга в дальнейшем онтогенезе.

*Ключевые слова:* пренатальная гипоксия, гиппокамп, HIF1

DOI: 10.31857/S1027813320030127

### ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что значительная часть распространенных заболеваний, в том числе неврологических и нервно-психических, возникает в результате повреждающего действия на мозг различных неблагоприятных факторов, среди которых ведущую роль занимает гипоксия/ишемия [1, 2]. Особенно опасно действие гипоксии в раннем онтогенезе – в период пренатального и раннего постнатального развития [3, 4]. Нарушения развития мозга вследствие этого воздействия проявляются на ранних стадиях постнатального развития, сохраняются у взрослых и усугубляются с возрастом, ведя к преждевременному старению и ранней смертности [5–8].

Ранее нами и другими исследователями было установлено, что тяжелая гипобарическая гипоксия в пренатальном периоде развития приводит к устойчивым нарушениям двигательного, эмоционального, исследовательского поведения и способности к обучению, в основе которых лежат

изменения функционирования центральной нервной системы на молекулярно-клеточном уровне [9, 10]. Патологии развития мозга, вызванные пренатальной гипоксией (ПГ), в первую очередь определяются стрессорным ответом матери на внешнее воздействие, в результате чего происходит выброс стрессовых гормонов в кровь, которые приводят к нарушениям в материнской и фетальной частях плаценты [11, 12]. В наших работах мы показали, что введение синтетического гормона дексаметазона или предьявление сеансов тяжелой гипобарической гипоксии на 14–16-е сутки беременности приводят к нарушениям развития мозга потомства, степень и направленность которых зависят от типа воздействия [9, 10]. В какой степени наблюдающиеся при повреждающих гипоксических/ишемических воздействиях во время беременности изменения обусловлены собственно гипоксическим фактором, а в какой – неспецифической стрессовой реакцией матери, до сих пор остается неясным. Гипоксия-индуцируемый фактор-1 (HIF1) является одним из основных регуляторов клеточного ответа на гипоксические воздействия [13–17], обеспечивая регуляцию экспрессии генов, участвующих в ан-

\* Адресат для корреспонденции: 199034 Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6; e-mail: vov210292@yandex.ru.

гиогенезе, анаэробном метаболизме, апоптозе [18, 19]. Чтобы оценить вклад гипоксической составляющей, было интересно изучить уровень экспрессии регуляторной альфа субъединицы HIF1, HIF1 $\alpha$ , и оценить интенсивность HIF1-зависимой транскрипции. Задачей настоящего исследования было оценить уровень содержания регуляторной альфа субъединицы гипоксия-индуцируемого фактора-1 (HIF1 $\alpha$ ), а также измерить количество мРНК HIF1-зависимых генов (активируемый HIF1 ген *ldha* [20] и супрессируемый HIF1 ген *gbpd* [21]) в гиппокампе 1-дневных крысят, подвергавшихся гипоксии на 14–16-е сутки пренатального развития.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные и модель пренатальной гипоксии.** Работа выполнена на взрослых самках крыс линии Wistar весом 300–350 г и их потомстве. Животные были получены из Биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и содержались в лабораторных условиях при свободном доступе к воде и пище. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Эксперименты проведены на 2 группах крыс: 1) контроль; 2) трехкратная тяжелая гипоксия (пренатальная гипоксия, ПГ).

Для создания ПГ беременных самок помещали трижды (на 14, 15 и 16 сутки беременности) в барокамеру проточного типа и снижали давление до 180 мм. рт. ст., что соответствует подъему на высоту 11000 м. Длительность воздействия 3 ч. Дальнейшая работа производилась на 1-дневных детенышах самцах (для каждой группы  $n = 6$ ).

**Пробоподготовка.** Гиппокамп быстро извлекали и замораживали в жидком азоте для дальнейшего выделения цитозольной и ядерной фракции и анализа белков интереса методом вестерн блот либо помещали в тризол (ThermoFisher, США) для экстракции РНК и последующего количественного анализа экспрессии генов интереса.

**Выделение ядерных и цитозольных белков, вестерн блот.** Ядерные и цитозольные белки ПГ и контрольных 1-дневных крысят выделяли с использованием коммерческого набора (78833, NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, ThermoFisher, США) согласно инструкции производителя. Белки разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли и осуществляли электроперенос на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США). Далее, после блокировки в течение 1 часа в 5% молоке, мембраны инкубировали

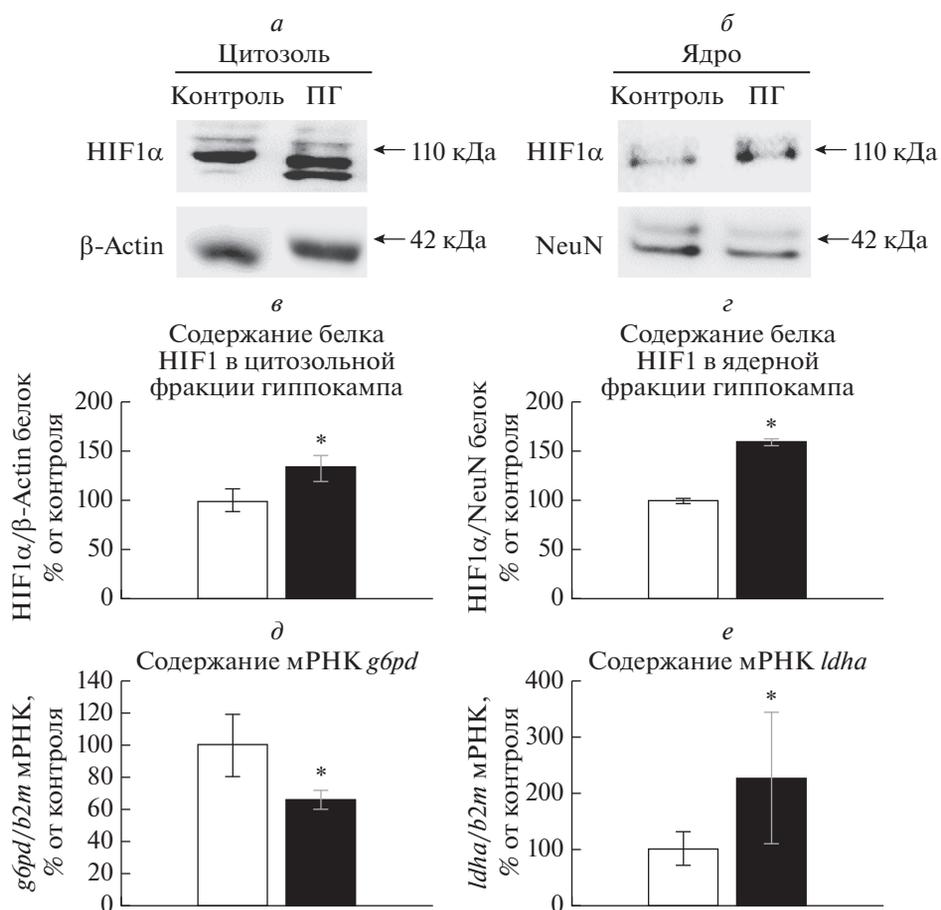
с кроличьими антителами против HIF1 $\alpha$  (1 : 1000, ab2185, Abcam, США) и  $\beta$ -актина (1 : 2000, a9044, Sigma Ald., США) или мышинными антителами против NeuN (1 : 2000, ab104224, Abcam, США) в течение ночи при +4°C. Мембраны отмывали в TBST буфере и инкубировали с противокроличьими (1 : 10000, a16096, Thermo Scientific, США) или противомышиными (1 : 40000, a9044, Sigma Ald., США) HRP-антителами в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Визуализацию белков интереса осуществляли с применением Clarity Max ECL хемилюминесцентного набора (Bio-Rad, США) используя систему документирования ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, США). Количественный анализ белка HIF1 $\alpha$  проводили с использованием программы ImageJ (NIH, Bethesda, MD, США) нормируя данные на  $\beta$ -actin (цитозольная фракция) или NeuN (ядерная фракция) для количественного анализа и с целью исключения влияния внутри- и межгрупповых особенностей клеточного состава тканей.

### Выделение и очистка РНК, обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени.

Общую РНК из гиппокампа 1-дневных крыс изолировали, используя ExtractRNA набор (BC032, Евроген, Россия), очищали от ДНК с применением DNaseI (EN0521, ThermoFisher, США) и CleanRNA Standard набор (BC033, Евроген, Россия) согласно инструкциям производителя. Синтез кДНК проводили из 1 мкг тотальной РНК используя набор MMLV Reverse Transcription Kit (SK021, Евроген, Россия). Количественную ПЦР в реальном времени проводили, используя qPCRmix-HS SYBR + LowROX набор (Евроген, Россия) на амплификаторе SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, США). Последовательности праймеров, температуры плавления и размеры фрагментов представлены в табл. 1.

Уровни содержания мРНК HIF1-зависимых генов (HIF1-активируемого гена лактатдегидрогеназы А (*ldha*) и HIF1-супрессируемого гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (*gbpd*)), нормированные на мРНК бета-2 микроглобулина (*b2m*) в качестве референса, были исследованы с использованием  $\Delta\Delta C_t$  метода.

**Статистическая обработка результатов.** Результаты обрабатывали с помощью пакетов анализа данных STATISTICA 7.0 Stat Soft, Inc и Microsoft Excel'2003, использовали непараметрический критерий Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test). Изменения считали достоверными при  $p \leq 0.05$ . Все результаты представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  SEM (standard error of the mean).



**Рис. 1.** Количество белка HIF1α в цитозольной (а, в) и ядерной (б, г) фракциях гиппокампа, количество мРНК HIF1-супрессируемого гена *gbpd* (д) и HIF1-активируемого гена *ldha* (е) в гиппокампе контрольных и ПГ 1-дневных крысят, переживших ПГ на 14–16 сутки эмбриогенеза. Данные представлены в % от контроля. Белые столбики – контроль, 100% (n = 6); черные столбики – ПГ (n = 6). \* Различия с контролем статистически достоверны,  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки влияния ПГ на активность системы HIF1 в гиппокампе 1-дневных ПГ крысят мы осуществили анализ распределения белка HIF1α между ядерной и цитозольной фракциями мето-

дом вестерн блот и провели количественный анализ мРНК HIF1-зависимых генов *ldha* и *gbpd*.

ПГ вызывает устойчивое увеличение накопления HIF1α в цитозольной фракции гиппокампа 1-дневных крысят (133% от контроля) (рис. 1а,

**Таблица 1.** Праймеры, использованные для количественной ПЦР в реальном времени

Ген	Праймеры (5'–3')	Температура плавления T, °C	Размер продукта, п.н.
Бета-2 микроглобулин ( <i>b2m</i> )	Forward TGCCATTCAGAAAACCTCCCC Reverse GAGGAAGTTGGGCTTCCCAT	57	73
Лактатдегидрогеназа А ( <i>ldha</i> )	Forward CGAGAGCATAATGAAGAAC Reverse TCCTTGATTCCATAGAGAC	57	75
Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа ( <i>gbpd</i> )	Forward AAGATGATGACCAAGAAG Reverse TTGTATCTGTTGCCATAG	57	80

1e), что сопровождается увеличением его количества и в ядерной фракции до 159% от контроля (рис. 1b, 1z). Увеличенная эффективность транслкации HIF1 $\alpha$  в ядро сопровождается уменьшением содержания мРНК HIF1-супрессируемого гена *g6pd* (рис. 1d) и увеличением содержания мРНК HIF1-индуцируемого гена *ldha* (рис. 1e) (66% и 226% от контроля, соответственно).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гипоксия является одним из наиболее важных и клинически значимых стрессорных воздействий на плод. До сих пор многие исследователи полагают, что основой патологии развития мозга при действии гипоксии в период пренатального онтогенеза является выброс стресс гормонов матери в ответ на повреждающее воздействие, которые влияют как на состояние плаценты, так и непосредственно на развитие пола. На модели пренатальной гипоксии Райса–Ванутси было показано значительное увеличение белка HIF-1 $\alpha$  в головном мозге 21-суточного плода (накануне родов), что является показателем гипоксии тканей головного мозга плода [1]. Полученные в настоящей работе данные показывают, что пренатальная гипоксия, предъявляемая в период закладки гиппокампа на 14–16-е сутки эмбриогенеза [3, 4], вызывает продолжительное увеличение содержания и активности транскрипционного фактора HIF1 $\alpha$ , сохраняющееся у новорожденных животных.

Увеличение количества и активности HIF1 в незрелых предшественниках нейронов гиппокампа посредством вовлечения эпигенетических механизмов может способствовать стабильному изменению экспрессии генов энергетического метаболизма [19, 21], тем самым нарушая функциональную активность нервных клеток в дальнейшем онтогенезе [10, 11]. Следовательно, одним из важных механизмов показанных нами ранее долговременных нарушений развития мозга вследствие воздействия тяжелой гипобарической гипоксии, предъявляемой крысам на 14–16-е сутки гестации [9], лежат HIF1-зависимые изменения метаболизма в гиппокампе на ранних стадиях онтогенеза.

### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-015-00336.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ.

*Конфликт интересов.* Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

*Этическое одобрение.* Все применимые международные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gonzalez-Rodriguez P.J., Xiong F., Li Y., Zhou J., Zhang L. // *Neurobiol. Dis.* 2014. V. 65. P. 172–179.
2. Li Y., Gonzalez P., Zhang L. // *Prog. Neurobiol.* 2012. V. 98. P. 145–165.
3. Golan H. and Huleihel M. // *Developmental Sci.* 2006. V. 9. P. 338–349.
4. Rice D., Barone S. // *Environmental Health Perspectives.* 2000. V. 108. P. 511–533.
5. Dudley K.J., Li X., Kobor M.S., Kippin T.E., Bredy T.W. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2011. V. 35. P. 1544–1551.
6. Xiong F., Zhang L. // *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2013. V. 34. P. 27–46.
7. Warner M.J., Ozanne S.E. // *Biochem. J.* 2010. V. 427. P. 333–347.
8. Langley-Evans S.C., McMullen S. // *Med. Princ. Pract.* 2010. V. 19. P. 87–98.
9. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Алёхин А.Н., Стратулов В.А. // *Журн. эволюционной физиологии и биохимии.* 2018. Т. 54. № 6. С. 404–410.
10. Tyul'kova E.I., Vataeva L.A., Stratilov V.A., Barysheva V.S., Vetrovoy O.V. // *Neurochemical J.* 2020. V. 14. № 1. P. 64–72.
11. Togher K.L., O'Keeffe M.M., Khashan A.S., Gutierrez H., Kenny L.C., O'Keeffe G.W. // *Epigenetics.* 2014. V. 9. № 6. P. 816–22.
12. Glover V., O'Donnell K.J., O'Connor T.G., Fisher J. // *Dev. Psychopathol.* 2018. V. 30. № 3. P. 843–854.
13. Semenza G.L., Neffelt M.K., Chi S.M., Antonarakis S.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 5680–5684.
14. Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 5510–5514.
15. Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wyckoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R., Ratcliffe P.J. // *Nature.* 1999. V. 399. P. 271–275.
16. Mircea I., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohn M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S., Kaelin W.G., Jr. // *Science.* 2001. V. 292. P. 464–468.
17. Jakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., von Kriegsheim A., Heberstreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. // *Science.* 2001. V. 292. P. 468–472.
18. Zarembek K.A., Malech H.L. // *J. Clin. Invest.* 2005. V. 115. P. 1702–1704.
19. Sharp F.R., Bernaudin M. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2004. V. 5. P. 437–448.
20. Greijer A.E., van der Groep P., Kemming D., Shvarts A., Semenza G.L., Meijer G.A., van de Wiel M.A., Belien J.A.M., van Diest P.J., van der Wall E. // *J. Pathology.* 2005. V. 206. № 3. P. 291–304.
21. Vetrovoy O., Sarieva K., Lomert E., Nimiritsky P., Eschenko N., Galkina O., Lyanguzov A., Tyulkova E., Rybnikova E. // *J. Molecular Neuroscience.* 2020. V. 70. P. 635–646.

## The Content and Activity of the Hypoxia-Inducible Factor HIF1 $\alpha$ Increases in the Hippocampus of Newborn Rats That Were Subjected to the Prenatal Hypoxia on 14–16 Days of Embryogenesis

O. V. Vetrovoy<sup>a, b</sup>, P. P. Nimiritsky<sup>c</sup>, E. I. Tyulkova<sup>a</sup>, and E. A. Rybnikova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Regulation of the Function of Brain Neurons, Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup>Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>c</sup>Institute of Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Center, Moscow State University, Moscow, Russia

The methods of Western blot and quantitative real-time PCR were used to study the content of the regulatory alpha subunit of hypoxia-inducible factor-1 (HIF1 $\alpha$ ) and the mRNA quantity of HIF1-regulated genes of lactate dehydrogenase A (*ldha*) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (*g6pd*) in the hippocampus of 1-day old rat pups whose mothers were subjected to three sessions of severe damaging hypoxia on days 14–16 of pregnancy. Prenatal hypoxia caused a stable increase in the HIF1 $\alpha$  content, and also led to an increase in the mRNA quantity of *ldha* and a decrease the *g6pd* mRNA level. The results indicate that changes in the hippocampal metabolism after prenatal hypoxia are stable which can cause disturbances in the energy metabolism of the brain in further ontogeny.

*Keywords:* prenatal hypoxia, hippocampus, HIF1