

На правах рукописи

**КИРОВА ЮЛИЯ ИГОРЕВНА**

**РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ СУКЦИНАТЗАВИСИМЫХ  
СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ (HIF-1 $\alpha$  и GPR91)  
ПРИ АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ  
(экспериментальное исследование)**

14.03.03 – патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва

2016

Работа выполнена в лаборатории биоэнергетики и проблем гипоксии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

**Научный консультант:**

**Лукьянова Людмила Дмитриевна**, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», лаборатория биоэнергетики и проблем гипоксии, заведующая лабораторией

**Официальные оппоненты:**

**Зинченко Валерий Петрович**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, лаборатория внутриклеточной сигнализации, заведующий лабораторией

**Миронова Галина Дмитриевна**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, лаборатория митохондриального транспорта, заведующая лабораторией

**Сазонтова Татьяна Геннадьевна**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», лаборатория адаптационной медицины, ведущий научный сотрудник

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П.Павлова Российской академии наук

Защита состоится «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.003.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (адрес сайта: <http://www.niiorp.ru>)

Автореферат разослан «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 001.003.01  
кандидат медицинских наук

Скуратовская Лариса Николаевна

### Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** Гипоксия – одно из самых распространенных патологических состояний, связанных с дефицитом кислорода в окружающей клетку среде и являющихся причиной широкого спектра функционально-метаболических нарушений в организме. Она может иметь самостоятельную этиологию, но может выступать в качестве сопутствующего фактора как при заболеваниях, связанных с нарушением функции дыхательной и сердечно-сосудистой систем, так и при подавляющем большинстве других патологий и усугублять их течение.

Распространенность патологий, включающих гипоксическую компоненту, определяет исключительную важность и необходимость понимания механизмов гипоксии, а также социальную значимость проблемы защиты организма от кислородной недостаточности и сопутствующего энергодефицита.

Мишенью гипоксии является аэробный энергетический обмен. Это имеет принципиальное значение для жизнедеятельности клетки в условиях дефицита кислорода. Нарушение синтеза энергии в этих условиях, приводящее к снижению уровня внутриклеточного АТФ ниже физиологической нормы и сопутствующему подавлению энергозависимых процессов, лежит в основе мультисистемности и полиорганности функционально-метаболических нарушений, характерных для гипоксии. Митохондриальная дыхательная цепь, ответственная за аэробный синтез энергии, является сенсором кислорода, регулятором и модулятором потребления кислорода и скорости его поступления из внеклеточной среды в клетку, т.е. участвует в поддержании кислородного гомеостаза (Лукьянова Л.Д., 1981-2011; Chandel N.S., Schumacker P.T., 2000; Devin A., Rigoulet M., 2007; Duchen M. et al., 2003; Lukyanova L.D., 1988-2013; Wheaton W., Chandel N., 2011). Митохондриальная дыхательная цепь не только принимает непосредственное участие в сложнейшей системе внутриклеточной и межклеточной сигнализации, но в условиях гипоксии участвует в формировании как ранних, так и поздних адаптивных признаков, благодаря чему обеспечивается формирование системного ответа организма на дефицит кислорода (Лукьянова Л.Д., 1997, 2011; Acker H., 1994; Lukyanova L.D., 2013, 2014; Lutz P.L., Prentis H.M., 2002; Michiels C., 2004; Wenger R., 2000; Seppet E. et al., 2009). Все это делает проблему регуляции энергетического обмена, поддержания и сохранения энергетического гомеостаза в клетке и на уровне организма исключительно актуальной и требует изучения и понимания механизмов его нарушения.

Согласно современным представлениям, увеличение резистентности к гипоксии сопряжено с регуляторным переключением потоков электронов в дыхательной цепи, направленным на активацию энергетически более эффективного в условиях гипоксии сукцинатоксидазного пути окисления субстратов (Кондрашова М.Н. и др., 1973; Кондрашова М.Н., Маевский Е.И., 1978; Лукьянова Л.Д., 1975 а,б, 1981, 1987, 2001, 2011). При отсутствии такого переключения срочные механизмы адаптации не формируются. Таким образом, сукцинат – субстрат цикла Кребса и

фермента дыхательной цепи сукцинатдегидрогеназы (СДГ; митохондриальный ферментный комплекс II - МФК II) - выполняет роль сигнальной молекулы, включающейся при гипоксии в поддержание жизненно важных метаболических процессов, т.е. в регуляторный процесс митохондриально-клеточно-системных взаимодействий, обеспечивающих формирование срочных механизмов адаптации к дефициту кислорода (Лукьянова Л.Д. и др., 2012).

Список исследований, посвященных вовлечению сукцината в регуляторные метаболические процессы, непрерывно расширяется. В последнее десятилетие было установлено, что две активно изучаемые системы – гипоксический транскрипционный фактор HIF-1 $\alpha$  (Semenza G.L., 2004) и рецептор GPR91 (He W. et al., 2004) - являются сукцинатзависимыми. Это позволяет предполагать не только их участие в механизмах адаптации к гипоксии, но и вовлечение митохондриальной дыхательной цепи в их регуляцию и ее участие во внутриклеточном сигналинге при кислород-дефицитных состояниях, сопровождающихся нарушением функции и метаболизма клеток и развитием различных патологий.

Однако систематические исследования этого вопроса отсутствуют, что и определило проведение данной работы.

**Цель диссертационной работы.** Проведение комплексных исследований роли транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  и сукцинатного рецептора GPR91 в формировании срочных и отсроченных, молекулярных и системных механизмов адаптации к гипоксии, их взаимодействия с дыхательной цепью и некоторыми другими сигнальными системами. Разработка способов предупреждения постгипоксических нарушений и оптимизации гипоксических воздействий на организм и усиления защитно-адаптивных механизмов в условиях дефицита кислорода.

#### **Задачи диссертационной работы:**

1. Изучить фенотипические и тканеспецифические особенности индукции транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  и сукцинатного рецептора GPR91 при разных режимах гипоксических воздействий и их связь с формированием молекулярных механизмов адаптации к гипоксическому стрессу и увеличением резистентности организма; выявить оптимальные условия для экспрессии этих факторов.

2. Изучить зависимость гипоксической индукции HIF-1 $\alpha$  и GPR91 в коре головного мозга (КГМ) – мишени для гипоксии - от эндогенного и экзогенного сукцината и их взаимодействие с различными сигнальными системами.

3. Изучить особенности генерации активных форм кислорода и активности системы глутатиона в КГМ при разных режимах гипоксических воздействий и их регуляторную роль в качестве индукторов активности HIF-1 $\alpha$  и GPR91 и адаптогенов.

4. Исследовать возможность модулирования работы сукцинатзависимых систем – HIF-1 $\alpha$  и GPR91 - с помощью фармакологических средств.

5. Дать оценку возможности терапевтического использования разных режимов гипоксических воздействий для оптимизации формирования адаптации к дефициту кислорода с учетом индивидуальных различий в устойчивости организма к гипоксии; предложить способы оптимизации реакции мозга на гипоксические воздействия и усиления защитно-адаптивных механизмов организма в условиях дефицита кислорода.

### **Научная новизна исследования**

Впервые обосновывается существование сукцинатзависимой сигнальной регуляции, реализующейся при гипоксии через активацию транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  и рецептора GPR91, направленной на формирование срочных и отсроченных молекулярных механизмов адаптации и увеличение резистентности организма к дефициту кислорода.

Впервые показано, что индуцируемая гипоксией срочная экспрессия транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  и рецептора GPR91 тканеспецифичны, фенотипичны, дозозависимы, сукцинатзависимы, имеют короткий латентный период (при разных режимах: менее 15-30 мин) и сопровождаются формированием срочной и отсроченной защитно-адаптивной резистентности животных к дефициту кислорода.

Впервые установлено существование в КГМ прямой зависимости между срочной гипоксической экспрессией HIF-1 $\alpha$ , внутриклеточным содержанием сукцината и активностью СДГ, а также обратной зависимости между экспрессией HIF-1 $\alpha$  и толерантностью организма к гипоксии. Доказано, что в КГМ HIF-1 $\alpha$  играет ключевую роль в формировании адаптации к гипоксии только у низкорезистентных животных.

Впервые получены сравнительные данные об особенностях распределения в тканях сукцинатного рецептора GPR91 и его корреляции с внутриклеточным содержанием сукцината и СДГ, особенностях динамики его гипоксической индукции, которая при любых использованных режимах гипоксии наиболее выражена в КГМ, и его вовлеченности в формирование срочных и отсроченных механизмов адаптации к гипоксии.

Доказано, что в условиях *in vivo* срочная гипоксическая сукцинатзависимая экспрессия HIF-1 $\alpha$  контролируется в КГМ двумя различными механизмами образования эндогенного сукцината: а) в цикле Кребса при активации СДГ и б) за счет функционирования специфического для мозга ГАМК-шунта.

Впервые показано, что при щадящих режимах гипоксии в механизм срочной гипоксической экспрессии HIF-1 $\alpha$  вовлекается белок теплового шока HSP90, защитное действие которого более выражено в КГМ неустойчивых к гипоксии крыс, но отсутствует влияние на этот процесс белка теплового шока HSP70. Таким образом,

установлено, что при гипоксии в условиях *in vivo* в нейронах КГМ реализуется сложная, многокомпонентная система срочного регулирования стабильности HIF-1 $\alpha$ , обеспечивающая оптимальные условия для экспрессии HIF-1 $\alpha$  и HIF-1 $\alpha$ -зависимых адаптивных генов.

В противоположность существующей в литературе точке зрения показано, что роль HIF-1 $\alpha$  как индуктора фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) наблюдается в очень ограниченном диапазоне неповреждающих сниженных концентраций O<sub>2</sub> во вдыхаемом воздухе и преимущественно в КГМ.

Впервые получены данные о положительной модуляции системы сукцинат-GPR91 в КГМ неустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) к гипоксии крыс при активации  $\beta$ -адренергических рецепторов.

Показано, что экзогенный сукцинат (мексидол; 40 мг/кг; в/б), введенный животным *in vivo*, способствует: 1) активации экспрессии HIF-1 $\alpha$  в КГМ в гипоксических условиях и не влияет на этот процесс в нормоксических условиях; 2) увеличению плотности GPR91 в КГМ крыс, т.е. выполняет роль лиганда этого рецептора как в нормоксических, так и гипоксических условиях. Для достижения максимально высокой плотности GPR91 в нормоксических условиях необходимо от 3-х до 8 ежедневных инъекций мексидола.

Установлено, что индукция GPR91 может быть связана с увеличением экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в КГМ НУ и ВУ крыс лишь в ограниченном диапазоне концентраций кислорода (при умеренных гипоксических воздействиях).

Впервые получены данные, свидетельствующие о различиях в работе системы глутатиона в КГМ двух фенотипов крыс, проявляющихся как в нормоксических, так и в гипоксических условиях. Доказано, что регуляторные свойства этой системы более сбалансированы в КГМ НУ крыс, нежели у ВУ, что подтверждается достоверно более низким содержанием окисленного глутатиона, гидроперекисных метаболитов и меньшей активностью ферментов цикла глутатиона в сравнении с ВУ и обеспечивает в условиях гипоксии лучшую антиоксидантную защиту мозга НУ особей сравнительно с ВУ.

Усиление свободнорадикальной активности и нарушение регуляторной функции системы глутатиона выявляются в КГМ при тяжелых гипоксических воздействиях и, следовательно, не являются индукторами экспрессии HIF-1 $\alpha$  и GPR91 при более мягких режимах гипоксических воздействий в условиях максимальной аккумуляции этих белковых факторов, т.е. не являются в этом случае триггерным механизмом.

### **Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы**

Настоящее исследование относится к мало разработанному и приоритетному для России биомедицинскому направлению – изучению молекулярных таргетных

механизмов адаптации организма к гипоксии. Впервые проведенное многопараметрическое сравнительное исследование активности двух сукцинатзависимых систем (HIF-1 $\alpha$  и GPR91) в широком диапазоне сниженных концентраций кислорода позволило доказать их вовлеченность в формирование срочных и отсроченных защитных механизмов адаптации и обосновать существование сукцинатзависимой сигнальной регуляции при гипоксии, реализующейся по принципу аутокринного сигнала.

Результаты являются инновационными, существенно расширяют и модифицируют современные представления о молекулярно-клеточных механизмах индивидуальной толерантности организма к гипоксии. Показано, что низкая базовая устойчивость к гипоксии сопряжена с высокими уровнями экспрессии HIF-1 $\alpha$  во всех тканях организма и, в особенности, в КГМ. HIF-1 $\alpha$  играет ключевую роль в формировании адаптации к гипоксии у НУ животных. Таким образом, проведенные исследования позволили выявить обратную зависимость между толерантностью организма к гипоксии и экспрессией HIF-1 $\alpha$ .

Полученные в работе данные позволили определить оптимальные для индукции HIF-1 $\alpha$  и GPR91 режимы однократного и курсового применения гипобарической гипоксии в условиях *in vivo* с учетом индивидуальной толерантности животных к дефициту кислорода, а также обосновать правомочность применения в гипоксических условиях экзогенного сукцината в качестве активатора этого процесса, ускоряющего формирование толерантности организма к гипоксии. Все это, в свою очередь, доказывает важность и необходимость специальной разработки режимов гипоксических воздействий (гипокситерапии) в спортивной и клинической медицине, методов мониторинга про-, дезадаптивных состояний, индуцируемых гипоксией, и при формировании терапевтических схем применения сукцинатсодержащих препаратов.

Тот факт, что экспрессия GPR91 развивается в КГМ НУ и ВУ крыс не только в условиях умеренной, но и тяжелой гипоксии при активации процессов свободнорадикального окисления и под контролем адренергической системы, позволяет рассматривать экспрессию сукцинатного рецептора как нейропротекторный механизм, реализующийся в условиях тяжелых гипоксических воздействий, сопряженных с развитием окислительного стресса.

Полученные данные позволили обосновать возможность клинического применения сукцинатсодержащих препаратов для направленного модулирования процессов адаптации к гипоксии, а также для защиты организма, в особенности головного мозга, в условиях гипоксии, ишемии, нейротоксических воздействий. Выводы диссертационной работы могут быть использованы при разработке индивидуальных режимов гипоксических воздействий в тех областях медицины, в которых традиционно используется гипокситерапия и гипоксические тренировки - в

спортивной, авиационной, космической, профилактической и реабилитационной медицине, кардиологии, неврологии, акушерстве.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Индуцируемая гипоксией срочная экспрессия транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  тканеспецифична, фенотипична, дозозависима и сукцинатзависима. Гипоксическая активация этой системы в КГМ - мишени для HIF-1 $\alpha$  - характерна для НУ к острой гипоксии крыс, выявляется при сниженных, но неповреждающих концентрациях кислорода во вдыхаемом воздухе, подавляется при тяжелых повреждающих режимах гипоксии и сопровождается формированием срочной защитно-адаптивной резистентности этих животных к дефициту кислорода.

2. Срочная гипоксическая экспрессия HIF-1 $\alpha$  в КГМ преимущественно НУ крыс зависит как от активности сукцинатоксидазного окисления (МФК II), так и от активности ГАМК-шунта и индуцируется сукцинатсодержащими препаратами, т.е. регулируется сукцинатом эндогенного и экзогенного происхождения.

3. Срочная гипоксическая индукция GPR91 – тканеспецифичный процесс, наиболее выраженный в КГМ (ткань-мишень) НУ к гипоксии животных. Она связана преимущественно с активностью ГАМК-шунта, являющегося в этих условиях главным источником эндогенного сукцината для рецептора, и регулируется сукцинатом экзогенного происхождения.

4. Усиление свободнорадикальной активности и нарушение регуляторной функции системы глутатиона, контролирующей антиоксидантную защиту в КГМ, выявляются при тяжелых гипоксических воздействиях, но отсутствуют при более мягких режимах гипоксии, в условиях максимальной индукции и аккумуляции HIF-1 $\alpha$  и GPR91 и, следовательно, не являются в этом случае триггерным механизмом их гипоксической экспрессии.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 280 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка использованной литературы, включающего 642 источника, в том числе 105 на русском и 537 на английском языках. Работа иллюстрирована 55 рисунками и 16 таблицами.

**Публикации.** По материалам диссертации было опубликовано 34 работы на русском и английском языках, в том числе 12 статей в журналах, соответствующих критериям и из списка ВАК.



**Апробация работы.** Материалы исследования были представлены на: IX Всемирном конгрессе Международного общества по адаптационной медицине (ISAM) (Тайпей, Тайвань, 2-5 августа 2009); Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 85-летию со дня основания института физиологии им. И.П. Павлова РАН «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды» (Санкт-Петербург-Колтуши, 7-10 декабря 2010); XXI Съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова (Калуга, 19-25 сентября 2010); Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 24-26 мая 2011); VI Российской конференции с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 11-13 октября 2011); XV Всероссийском симпозиуме, посвященном 50-летию кафедры нормальной физиологии РУДН «Эколого-физиологические проблемы адаптации» (Москва, 6-9 июня 2012); II Международной научной конференции «Высокогорная гипоксия и геном» (Кабардино-Балкария, Приэльбрусье, Терскол, 14-17 августа 2012); X Всемирном конгрессе Международного общества по адаптационной медицине (ISAM) (Будапешт, Румыния, 7-10 июня 2012); III Российской конференции с международным участием «Проблемы нарушения клеточной энергетики (Митохондриальная патология)» (Москва, 23-25 октября 2012); IV Международном симпозиуме «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (Санкт-Петербург, 18-21 июня 2013); Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург-Колтуши, 24-26 июня 2014); IV Съезде физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 8-12 октября 2014); XI Всемирном конгрессе Международного общества по адаптационной медицине (Йонаго, Япония, 27-30 мая 2015); Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 25-28 мая 2015).

**Личный вклад автора.** Разработка общего плана исследования, выбор методических подходов и схем экспериментов, интерпретация данных были выполнены автором совместно с научным консультантом исследования Л.Д. Лукьяновой. Подготовка животных к экспериментам (ранжирование по индивидуальной устойчивости к гипоксии), введение препаратов, экспонирование животных в условиях разных режимов ГБГ, тестирование общей резистентности организма к острой гипоксии после введения препаратов и гипоксических тренировок осуществлялась автором совместно с Э.Л. Германовой. Весь комплекс лабораторно-аналитических работ (биохимические тесты, иммуноблоттинг, иммуногистохимические, морфологические исследования) и статистическая обработка данных были выполнены лично автором.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было проведено в лаборатории биоэнергетики и проблем гипоксии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Работа была выполнена на 765 самцах белых беспородных крыс весом 200-250г, выращенных в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» при свободном доступе к воде и пище, естественном чередовании суточной освещенности. Содержание животных и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». Крыс предварительно (за 4 недели до экспериментов) тестировали по их чувствительности к острой гипобарической гипоксии и ранжировали на высоко- (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) (Березовский В.А., 1978).

### ***Применяемые режимы гипобарической гипоксии (ГБГ).***

*Острую гипобарическую гипоксию* (ОГБГ; подъем на высоту 11,5 тыс. м; атм. давление 180 мм рт.ст; 3% O<sub>2</sub>), моделировали в барокамере проточного типа и применяли для тестирования базовой (индивидуальной) чувствительности животного к гипоксии, а также для оценки изменений резистентности животных после используемых гипоксических воздействий.

*Режимы ГБГ разной тяжести, используемые однократно и многократно (курсовая ГБГ):* (1) ГБГ<sub>3000</sub> – «слабая» гипоксия (пороговый, неповреждающий режим) – подъем на высоту 3000 м; атм. давление 526 мм рт.ст.; 14% O<sub>2</sub>; (2) ГБГ<sub>5000</sub> – гипоксия «средней тяжести» – подъем на высоту 5000 м; атм. давление 380 мм рт.ст.; 10,5% O<sub>2</sub>; (3) ГБГ<sub>7000</sub> – «тяжелая» гипоксия – подъем на высоту 7000 м; атм. давление 290 мм рт.ст.; 8% O<sub>2</sub>.

***Иммуноблоттинг (Вестерн-блот анализ)*** использовали для определения HIF-1 $\alpha$  в ядерном экстракте тканей (Chilov D. et al., 1999; Zhang X. et al., 1997); GPR91, VEGF, HSP90, HSP70, СДГ (субъединица A) – в цитоплазматическом экстракте (Chilov D. et al., 1999). Белки подготовленных проб разделяли в полиакриламидном геле (ПААГ) разной плотности в зависимости от молекулярной массы анализируемых белков: 8% (HIF-1 $\alpha$ ), 10% (HSP90, HSP70, СДГ), 15% (GPR91, VEGF). Разделенные белки переносили с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану электроэлюцией. Использовали первые поликлональные антитела (Santa Cruz Biotechnology, США) в разведении 1:500 и вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology, США) в разведении 1:5000. Детектирование белков осуществляли в реакции с ECL-реагентами (Pierce Biotechnology, Inc., США) на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop. О содержании искомым белков судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Результат выражали в относительных денситометрических единицах (ОДЕ).

***Гистологическая обработка ткани мозга.*** Образцы ткани мозга крыс фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 24 часов. Далее после стандартных

гистологических процедур проводки и заливки в парафин изготавливали срезы толщиной 7 мкм на уровне 4,7 мм от брегмы (Paxinos G., Watson C., 1998) и монтировали на стекла. Окрашивание по Нислю производили в 0,5% растворе крезилвиолета. Для иммуноцитохимического анализа депарафинизированные срезы подвергали высокотемпературной демаскировке в цитратном буфере, инкубировали с первыми поликлональными антителами в разведении 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, США) и вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, США), окрашивали диаминобензидином.

**Биохимические методы.** Активность *глутатионпероксидазы* (ГПО) определяли спектрофотометрическим методом, основанным на сопряжении глутатионпероксидазной и глутатионредуктазной реакций (Paglia D.E., Valentine W.N. 1967), по скорости окисления НАДФН ( $\lambda=340$  нм) в присутствии гидропероксида трет-бутила (0,2 ммоль/л), восстановленного глутатиона (3 мМ) и 1 ед глутатионредуктазы дрожжей. Активность *глутатионредуктазы* (ГР) определяли в присутствии 1,5 мМ окисленного глутатиона путем измерения скорости окисления НАДФН (0,5 мМ) при 340 нм. Активность *Cu,Zn-супероксиддисмутазы* (Cu,Zn-SOD) определяли спектрофотометрическим методом по ингибированию реакции восстановления нитротетразолия синего супероксидным анионом (Fried R., 1975). Использовали неферментативную систему генерации супероксидного радикала, включающую донор электронов НАДН (0,6 мМ) и переносчик электронов на кислород феназинметасульфат (0,8 мкМ). Детекция супероксидных радикалов осуществлялась с помощью нитротетразолия синего (0,05 мМ), восстановление которого сопровождается образованием окрашенного формазана (560 нм). Активность *каталазы* определяли спектрофотометрическим методом, основанным на образовании стабильного комплекса (пероксомолибдата) при взаимодействии  $H_2O_2$  и молибдата аммония  $((NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O)$  (350 нм) (Goth L., 1991). Содержание *восстановленного глутатиона* (GSH) определяли спектрофотометрически, используя 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную) кислоту (ДТНБ; реактив Элмана) как специфичный реагент для обнаружения тиоловых групп GSH при pH 7,0-8,0 (Sedlak J., Lindsay R.N., 1968). Определение содержания *общего глутатиона* (G) проводили после восстановления в пробах окисленного глутатиона в присутствии 2,5 ед глутатионредуктазы дрожжей и 0,3 мМ НАДФН. При добавлении ДТНБ (0,15 мМ) развивалось окрашивание (412 нм). Содержание *окисленного глутатиона* (GSSG) определяли по разности между содержанием общего и восстановленного глутатиона. **Содержание гидроперекисных метаболитов** ( $H_2O_2$ , гидроперекиси липидов) (ГП) определяли спектрофотометрическим методом, основанным на реакции окисления пероксидами Fe(II) до Fe(III) в присутствии ксиленола оранжевого (0,1 мМ) с последующим образованием красно-фиолетового ферроксиленолового комплекса с максимумом поглощения при 580 нм (Hermes-Lima M. et al., 1995). Содержание *диеновых конъюгатов полиненасыщенных жирных кислот* (ДК) определяли спектрофотометрически по величине оптической плотности проб при 233 нм –

область поглощения соединений, содержащих две сопряженные двойные связи (Волчегорский И.А. и др., 1989; Гаврилов В.Б. и др., 1988). **Содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой** (ТБК-РП) оценивали спектрофотометрическим методом (Ohkawa H. et al., 1979), основанным на образовании окрашенного триметинового комплекса (532 нм) малонового диальдегида с ТБК.

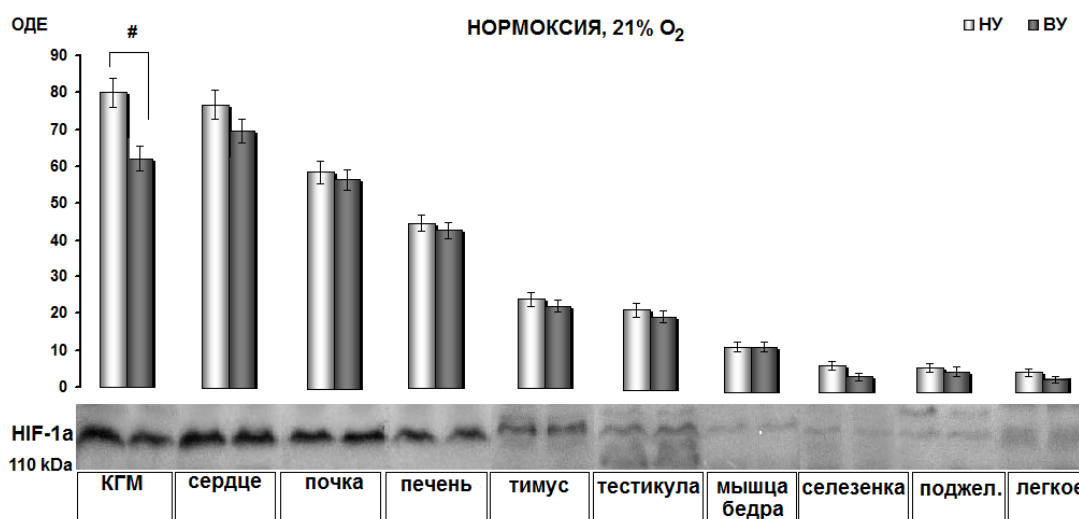
**Выделение митохондриальной фракции** ткани мозга проводили с использованием метода дифференциального центрифугирования (McIlwain H., Rodnight R., 1962) в модификации (Ещенко Н.Д., 1982). Активность **СДГ** определяли спектрофотометрическим методом Т.Р. Singer и Е.В. Kearney (1957) в модификации (Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г., 1982), основанным на окислении сукцинатдегидрогеназой янтарной кислоты и восстановлении окрашенного феррицианида калия (420 нм) до бесцветного ферроцианида. **Содержание сукцината в тканях** определяли энзиматическим методом (Кондрашова М.Н., Чаговец Н.Р., 1971; Singer Т.Р., Kearney Е.В., 1957) в модификации (Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г., 1982). Янтарная кислота, содержащаяся в пробе окисляется сукцинатдегидрогеназой. Реакция сопряжена с восстановлением искусственного акцептора электронов – феррицианида калия (окрашенное соединение; 420 нм) до бесцветного ферроцианида. **Содержание сукцината в сыворотке крови** определяли с помощью коммерческого набора реактивов (Succinate Colorimetric Assay Kit; МАК184; Sigma-Aldrich, США). Для колориметрического определения сукцината (450 нм) оптическую плотность регистрировали с использованием полуавтоматического иммуноферментного микропланшетного анализатора «ImmunoChem-2100» (High Tecnology, США).

В работе были использованы сукцинатсодержащие препараты – мексидол (3-окси-6-метил-2-этил-пиридина сукцинат), проксипин (2-этил-3(N,N-диметилкарбамоилокси)-6-метилпиридина сукцинат) и янтарная кислота (сукцинат). В острых экспериментах для всех препаратов была использована доза 40 мг/кг - в/б. При длительном введении (ежедневно на протяжении 12 дней, 40 мг/кг, в/б) использовали инъекционную форму мексидола (мексидол 5%, ампульная форма, производитель ООО «НПК Фармасофт»).

Статистический анализ данных выполняли с помощью программных пакетов Statistica 6,0 (Statsoft Inc., USA). В случае нормального распределения данных средние величины выборок сравнивали, используя t-критерий Стьюдента. При распределении данных отличным от нормального применяли непараметрический ранговый U-критерий Уилкоксона (Манна-Уитни). Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде: среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Для анализа сопряженных биохимических показателей рассчитывали коэффициент корреляции (r) (коэффициент Пирсона при нормальном распределении данных или коэффициент корреляции рангов Спирмена при распределении данных отличным от нормального).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Роль HIF-1 $\alpha$  в ответной реакции организма на гипоксию и формировании адаптивных процессов.** Определение базовой экспрессии HIF-1 $\alpha$  в тканях животных с исходными индивидуальными различиями в толерантности к гипоксии показало, что несмотря на O<sub>2</sub>-зависимую деградацию в условиях нормоксии (Huang L.E. et al., 1998; Kallio P.J. et al., 1999; Salceda S., Caro J., 1997; Semenza G.L., 2004) HIF-1 $\alpha$  в разной степени идентифицируется во всех тестируемых тканях, но более всего в КГМ и миокарде (рис. 1). Таким образом, его распределение *тканеспецифично*. Данные свидетельствуют о вовлеченности HIF-1 $\alpha$  в механизмы функционирования тканей в условиях физиологической нормы. Фенотипические различия в базовом содержании HIF-1 $\alpha$  выявляются во всех тестируемых органах крыс: у ВУ оно меньше, чем у НУ. Наиболее отчетливо фенотипические различия проявляются в КГМ (рис. 1, табл. 1).



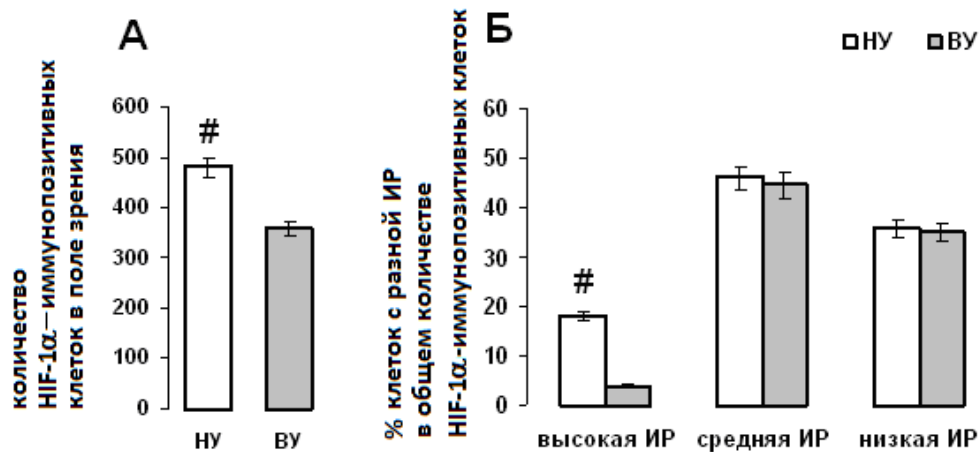
**Рис. 1. Базовое (в условиях нормоксии) содержание HIF-1 $\alpha$  в тканях НУ и ВУ крыс.** Представлены данные количественного анализа иммуноблотов HIF-1 $\alpha$  (тестировались ядерные экстракты органов НУ и ВУ крыс). Наиболее высокое содержание HIF-1 $\alpha$  выявлялось в КГМ и миокарде. В КГМ НУ крыс уровень HIF-1 $\alpha$  значительно выше по сравнению с ВУ. # - статистически значимые различия между фенотипами ( $p < 0,01$ ).

**Таблица 1. Зависимость базового (в условиях нормоксии) содержания HIF-1 $\alpha$  в КГМ от резистентности (ВЖ, мин, сек) крыс к острой гипоксии (в % к содержанию HIF-1 $\alpha$  у наиболее резистентных животных).**

Время жизни (ВЖ) в условиях ОГБГ	8'40''	4'20''	2'20''	1'20''	0'40''
HIF-1 $\alpha$ , %	100	116	158 <sup>#</sup>	174 <sup>#</sup>	173 <sup>#</sup>

# - статистически значимые отличия по сравнению с наиболее резистентными животными ( $p < 0,05$ ).

Установленные с помощью Вестерн-блот анализа различия в базовой экспрессии HIF-1 $\alpha$  в КГМ НУ и ВУ крыс (рис. 1, табл. 1) получили подтверждение в иммуногистохимическом исследовании экспрессии HIF-1 $\alpha$  в префронтальной КГМ обоих фенотипов животных. При этом было показано, что нейроны КГМ как НУ, так и ВУ крыс обладают способностью в нормоксических условиях экспрессировать и накапливать HIF-1 $\alpha$ , количество HIF-1 $\alpha$ -экспрессирующих нейронов в КГМ НУ крыс достоверно больше, чем у ВУ, так же как количество клеток с высоким уровнем экспрессии HIF-1 $\alpha$  (рис. 2).



**Рис. 2.** Данные иммуногистохимического определения базовой (в условиях нормоксии) экспрессии HIF-1 $\alpha$  в срезах префронтальной КГМ НУ и ВУ крыс. Общее количество HIF-1 $\alpha$ -иммунопозитивных клеток (А) и клеток с высоким уровнем экспрессии HIF-1 $\alpha$  (высокой HIF-1 $\alpha$ -иммунореактивностью (ИР)) (Б) достоверно выше в срезах префронтальной КГМ НУ крыс. # – статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ) между фенотипами НУ и ВУ крыс.

Таким образом, установлено существование обратной зависимости между базовым содержанием HIF-1 $\alpha$  в нейронах КГМ и толерантностью животных к гипоксии: врожденная (генетически запрограммированная) толерантность организма к дефициту кислорода сопряжена не с высокими, как можно было бы ожидать, а со сниженными уровнями экспрессии HIF-1 $\alpha$ . И наоборот, наиболее интенсивная экспрессия HIF-1 $\alpha$  характеризует низкотолерантных к гипоксии животных. Эти данные могут свидетельствовать о существенно большей функциональной значимости системы HIF-1 $\alpha$  для нейронов КГМ НУ крыс сравнительно с ВУ.

Тканеспецифические и фенотипические различия в содержании HIF-1 $\alpha$  проявляются не только *при нормоксии*, но и *при гипоксии*. Для изучения гипоксической экспрессии HIF-1 $\alpha$  при разных режимах гипоксии были использованы три ткани с высоким базовым уровнем содержания HIF-1 $\alpha$ : КГМ, миокард и печень.

*Срочная гипоксическая экспрессия HIF-1 $\alpha$*  в ответ на *однократное гипоксическое воздействие* индуцируется во всех исследованных тканях НУ животных в ограниченном диапазоне сниженных концентраций O<sub>2</sub> во вдыхаемом

воздухе, специфичном для каждой ткани. Наибольшая зависимость срочной экспрессии HIF-1 $\alpha$  от концентрации O<sub>2</sub> была характерна для КГМ НУ крыс (рис. 3А). В этом случае достоверная индукция HIF-1 $\alpha$  развивалась при неповреждающих гипоксических воздействиях (ГБГ<sub>3000</sub>-14% O<sub>2</sub> и ГБГ<sub>5000</sub>-10,5% O<sub>2</sub>) уже через 30-45 минут, достигала максимальных значений в течение часа и сопровождалась формированием срочной защитно-адаптивной резистентности этих животных к дефициту кислорода. В отличие от НУ животных срочная экспрессия HIF-1 $\alpha$  в КГМ и миокарде ВУ крыс в аналогичных гипоксических условиях не развивалась (рис. 3 А,Б). В печени НУ и ВУ крыс срочная индукция HIF-1 $\alpha$  отсутствовала на фоне «слабого» гипоксического воздействия (ГБГ<sub>3000</sub>-14% O<sub>2</sub>), но развивалась при гипоксии «средней тяжести». При этом фенотипические различия отсутствовали (рис. 3В).

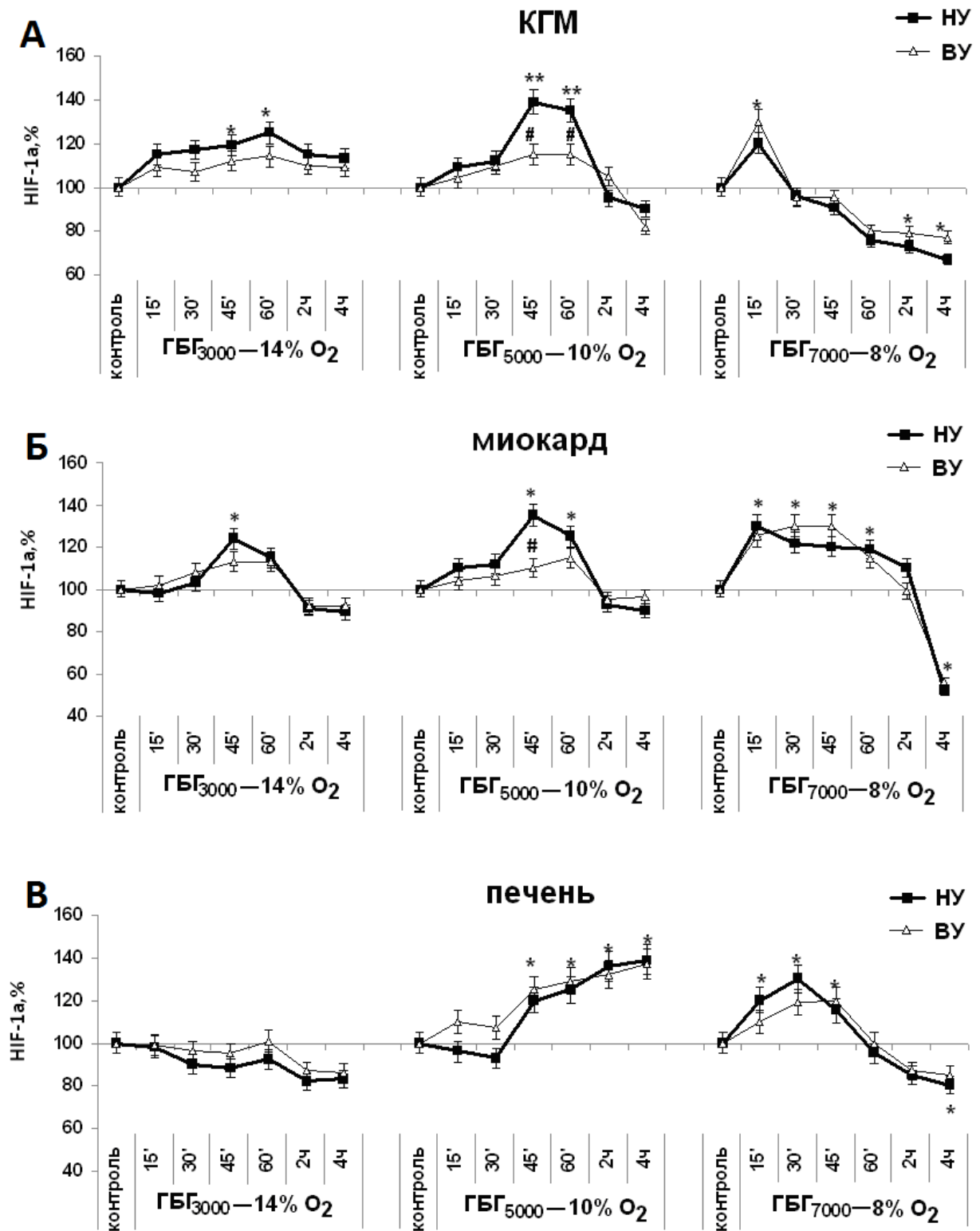
Таким образом, система HIF-1 $\alpha$  используется при формировании срочных механизмов адаптации преимущественно у одного фенотипа - НУ животных. Следовательно, высокая исходная толерантность к гипоксии ВУ животных обеспечивается другими механизмами. Тот факт, что индукция системы HIF-1 $\alpha$  как в нормоксических, так и гипоксических условиях максимально выражена в нейронах КГМ НУ крыс, говорит об особой роли КГМ в формировании системного ответа НУ особой на гипоксию.

В условиях «тяжелой» гипоксии (ГБГ<sub>7000</sub>-8% O<sub>2</sub>) индукция HIF-1 $\alpha$  в тканях НУ и ВУ крыс была кратковременной и сменялась (в КГМ уже через 60 мин) падением уровня HIF-1 $\alpha$  существенно ниже базового (рис. 3А). Следовательно, протективные и проадаптивные эффекты HIF-1 $\alpha$  в условиях тяжелой гипоксии не реализуются.

Полученные результаты позволили сделать вывод, что оптимальным гипоксическим режимом для индукции срочной экспрессии HIF-1 $\alpha$  во всех исследованных тканях является часовое воздействие ГБГ<sub>5000</sub>-10,5% O<sub>2</sub>.

При *многократном (курсовом)* ежедневном одночасовом применении неповреждающих гипоксических воздействий срочная и отсроченная (через 24ч после воздействия) гипоксическая экспрессия HIF-1 $\alpha$  развивалась в КГМ и миокарде НУ крыс после каждого очередного воздействия лишь на протяжении первых 8 воздействий (рис. 4 А,Б), что совпадало с периодом формирования *отсроченной* толерантности организма к дефициту кислорода. Снижение ее интенсивности при последующих гипоксических воздействиях может отражать завершение формирования адаптации организма НУ крыс к гипоксическому стимулу заданной силы, продолжительности и частоты. То, что адаптивное повышение уровня HIF-1 $\alpha$  при курсовом гипоксическом воздействии - явление преходящее, может иметь защитное действие, так как ограничивает возможность неконтролируемого развития пролиферативных процессов, инициирующих канцерогенез.

В КГМ и миокарде ВУ крыс в условиях многократных неповреждающих гипоксических воздействий индукция HIF-1 $\alpha$  отсутствовала (рис. 4 А,Б), также как при однократном воздействии.



**Рис. 3. Зависимость срочной экспрессии HIF-1α в КГМ (А), миокарде (Б), печени (В) НУ и ВУ крыс от длительности и тяжести однократного гипоксического воздействия.** На рисунке представлены результаты количественного анализа иммуноблотов, демонстрирующие динамику экспрессии HIF-1α (в % от контроля) в КГМ, миокарде, печени НУ и ВУ крыс при однократном воздействии разных режимов ГБГ в различной их продолжительности (15', 30', 45', 60' - мин; 2ч, 4ч - часы). \* - данные отличаются от контроля ( $p < 0,05$ ); \*\* - данные отличаются от контроля ( $p < 0,01$ ); # - различия между фенотипами ( $p < 0,05$ ).



В печени НУ и ВУ крыс индукция HIF-1 $\alpha$  выявлялась только после 1-2 воздействий гипоксии «средней тяжести». Отличия между фенотипами отсутствовали (рис. 4В).

Наблюдаемые фенотипические различия в интенсивности гипоксической экспрессии HIF-1 $\alpha$  в КГМ и миокарде свидетельствуют о существовании двух различных молекулярных механизмов формирования толерантности к гипоксии: HIF-1-зависимого и HIF-1-независимого.

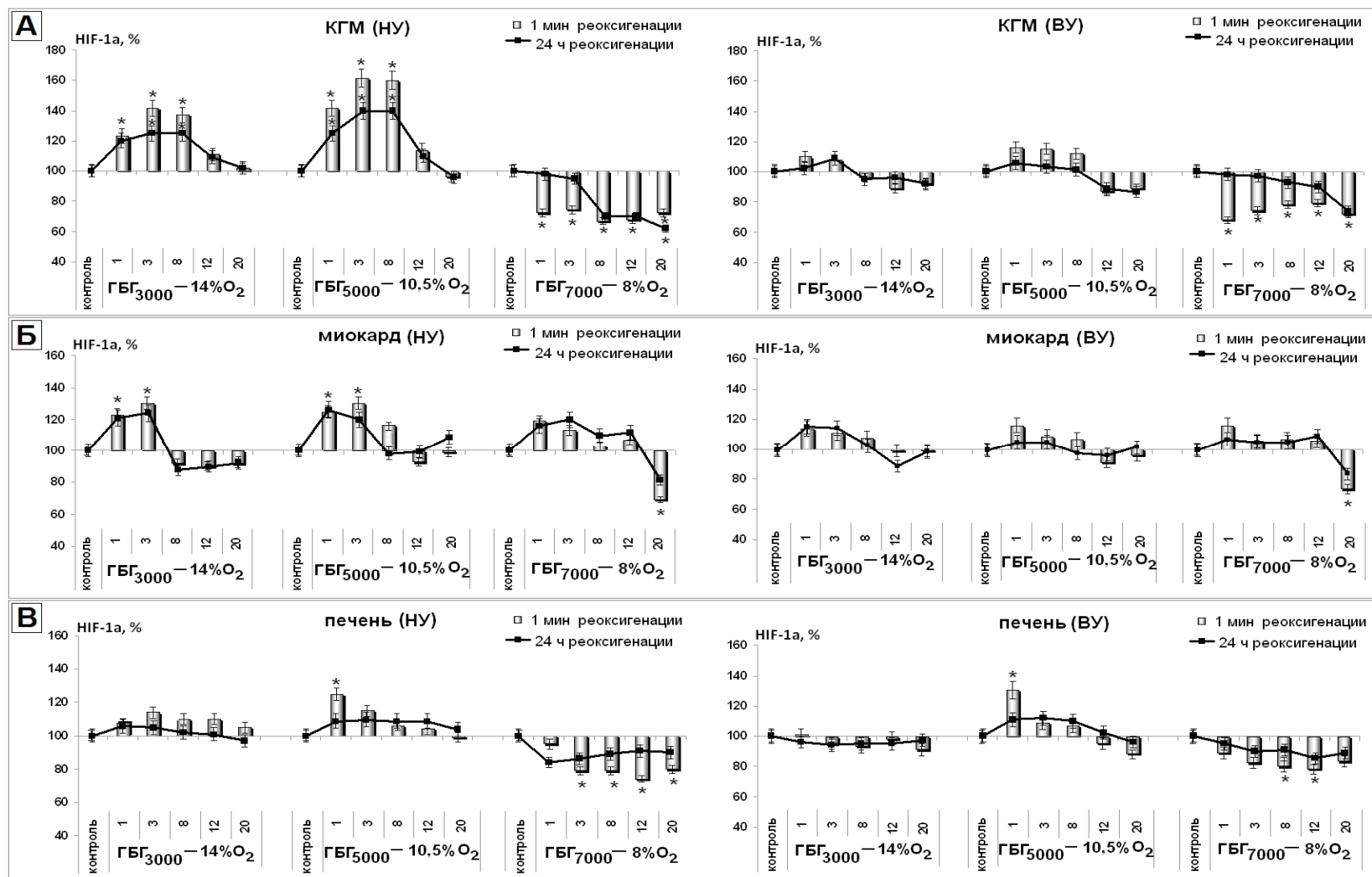
Многократное применение «тяжелой» гипоксии вызывало супрессию HIF-1 $\alpha$  во всех тестируемых тканях НУ и ВУ крыс (рис. 4). Наиболее раннее и устойчивое подавление экспрессии HIF-1 $\alpha$  наблюдали в КГМ обоих фенотипов крыс (рис. 4А), что свидетельствует об ограничении HIF-1 $\alpha$ -зависимых протективных и проадаптивных механизмов в ткани мозга в условиях «тяжелой» гипоксии.

Индукция HIF-1 $\alpha$  в тканях НУ крыс в ходе курса гипоксии «средней тяжести» сопровождалась увеличением общей резистентности организма к острой гипоксии в 2,5-3 раза, а также индукцией фактора роста эндотелия сосудов VEGF (маркера транскрипционной активности HIF-1 $\alpha$ ) (Ferrara N. et al., 2003, Semenza G.L. et al., 2006), наиболее выраженной в КГМ и миокарде. Положительная корреляция между динамикой срочной гипоксической экспрессии HIF-1 $\alpha$  и VEGF в условиях применяемых нами режимов гипоксии, свидетельствующая о HIF-1 $\alpha$ -зависимой индукции VEGF, наблюдалась лишь в ограниченном диапазоне концентраций O<sub>2</sub> во вдыхаемом воздухе (ГБГ<sub>5000</sub>, 10,5% O<sub>2</sub>). Таким образом, в тканях НУ крыс при гипоксии «средней тяжести» HIF-1 $\alpha$  вовлекается в процесс формирования адаптивных признаков.

В отличие от НУ животных, в КГМ и миокарде ВУ крыс в условиях многократных воздействий неповреждающих режимов гипоксии, так же как при их однократном применении, индукция HIF-1 $\alpha$  отсутствовала. Резистентность животных к острой гипоксии также не менялась, тем не менее, содержание VEGF в КГМ и миокарде значимо увеличивалось, что свидетельствует о возможности инициации в этих тканях ВУ крыс HIF-1 $\alpha$ -независимых механизмов адаптации к гипоксии.

Выявленная нами в условиях неповреждающих гипоксических воздействий достоверная индукция HIF-1 $\alpha$  в КГМ НУ крыс, а также отсутствие этого явления в КГМ ВУ животных, определила проведение следующего этапа работы - изучение механизмов, задействованных в модуляции гипоксической индукции HIF-1 $\alpha$  – именно на ткани КГМ.

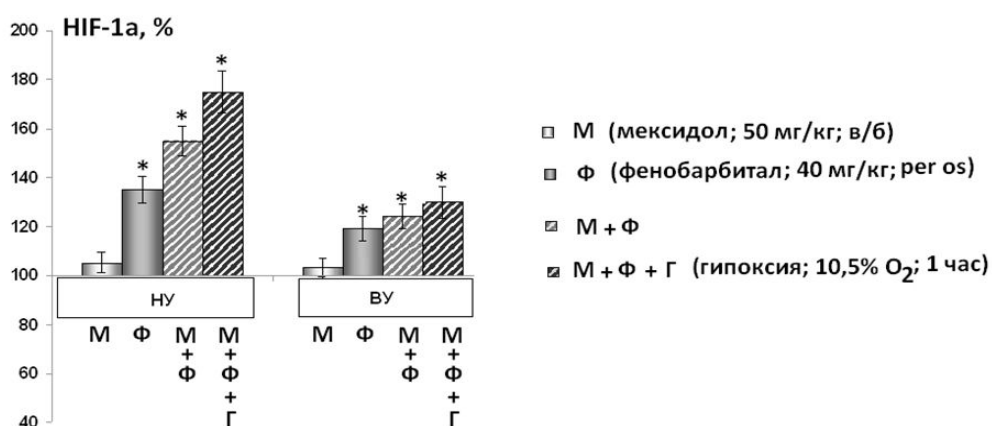
Известно, что *гипоксическая стабилизация HIF-1 $\alpha$*  сукцинатзависима: сукцинат ингибирует пролилгидроксилазные реакции, иницирующие убиквитин-зависимый протеолиз HIF-1 $\alpha$  и препятствующие аккумуляции гипоксического фактора транскрипции (Lu H. et al., 2005; Pan Y. et al., 2007; Selak M.A. et al., 2005; Semenza G.L., 2004). Это позволяет предполагать, что гипоксическая экспрессия HIF-1 $\alpha$  может быть связана с репрограммированием работы дыхательной цепи (подавление активности МФК I и окисления НАД-зависимых субстратов и активация МФК II и сукцинатоксидазного окисления).



**Рис. 4.** Влияние многократного (курсового) применения разных режимов ГБГ на экспрессию HIF-1 $\alpha$  в КГМ (А), миокарде (Б), печени (В) НУ и ВУ крыс. На рисунке представлены результаты количественного анализа иммуноблотов HIF-1 $\alpha$  (в % от контроля). 1,3,8,12,20 – количество одночасовых ежедневных воздействий ГБГ (тренингов). 1 мин, 24ч – продолжительность постгипоксического периода. \* - данные отличаются от контроля (p<0,05).

Действительно, при экспериментальном моделировании гипоксии путем ингибирования МФК I его неспецифическим ингибитором фенобарбиталом, который, как известно, является миметиком гипоксии и дозозависимо подавляет НАД-зависимое окисление даже в условиях *in vivo*, восстанавливая при этом пиридиннуклеотиды и подавляя дыхание (Чернобаева Г.Н и др. 1989, 1991, 1993), мы наблюдали дозозависимую индукцию экспрессии HIF-1 $\alpha$ , которая развивалась в КГМ обоих типов крыс, но у НУ крыс она была выражена сильнее (рис. 5). Таким образом, подавление функции МФК I, действительно, индуцирует экспрессию HIF-1 $\alpha$ , которая может быть связана с компенсаторной активацией в этих условиях сукцинатоксидазного окисления, влекущего за собой стабилизацию HIF-1 $\alpha$ .

Введение на фоне фенобарбитала экзогенного сукцината приводило к усилению экспрессии HIF-1 $\alpha$ , более выраженному в КГМ НУ крыс (рис. 5). Однако, введение экзогенного сукцината в условиях *нормоксии* при отсутствии переключения работы дыхательной цепи на сукцинатоксидазное окисление и высокой активности МФК I не вызывало индукции HIF-1 $\alpha$  (рис. 5).



**Рис. 5. Экспрессия HIF-1 $\alpha$  в КГМ НУ и ВУ крыс при ингибировании I комплекса дыхательных ферментов фенобарбиталом в условиях нормоксии (в % от контроля, принятого за 100%).** \* - данные статистически достоверно ( $p < 0,01$ ) отличаются от контроля.

Фенотипические различия в ответной реакции HIF-1 $\alpha$  на фенобарбитал свидетельствуют о неодинаковой базовой активности МФК I в КГМ НУ и ВУ животных, что согласуется с данными других авторов, показавших, что активность МФК I в КГМ ВУ крыс в условиях нормоксии выше, чем у НУ крыс, и при гипоксии нарушается в меньшей степени (Корнеев А.А., Лукьянова Л.Д., 1987; Лукьянова Л.Д. и др., 1976, 1978; Лукьянова Л.Д., Коробков А.В., 1981).

В отличие от эффектов фенобарбитала, при ингибировании СДГ (МФК II) его конкурентным ингибитором малонатом гипоксическая экспрессия HIF-1 $\alpha$  в КГМ не развивалась и уровень гипоксического фактора значительно снижался сравнительно с базовым, что является еще одним подтверждением зависимости экспрессии HIF-1 $\alpha$  от сукцинатоксидазного окисления (рис. 6).

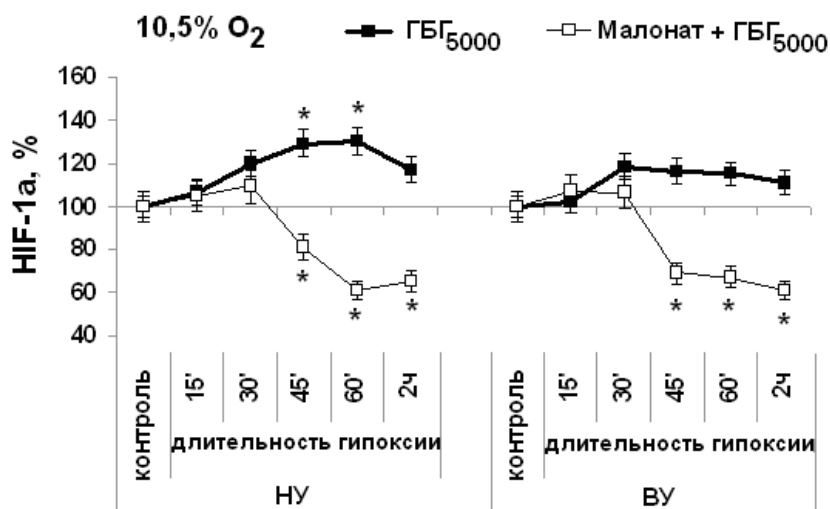


Рис. 6. Динамика гипоксической экспрессии HIF-1 $\alpha$  в КГМ НУ и ВУ крыс при ингибировании активности СДГ (МФК II) малонатом натрия (40 мг/кг; в/б; за 30 мин до ГБГ<sub>5000</sub>-10,5% O<sub>2</sub>) (в % от контроля).

\* - данные статистически достоверно отличаются от контроля ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, срочная сукцинатзависимая гипоксическая экспрессия HIF-1 $\alpha$  в КГМ регулируется состоянием субстратного участка митохондриальной дыхательной цепи: ее индукция усиливается при активации МФК II и подавлении активности МФК I.

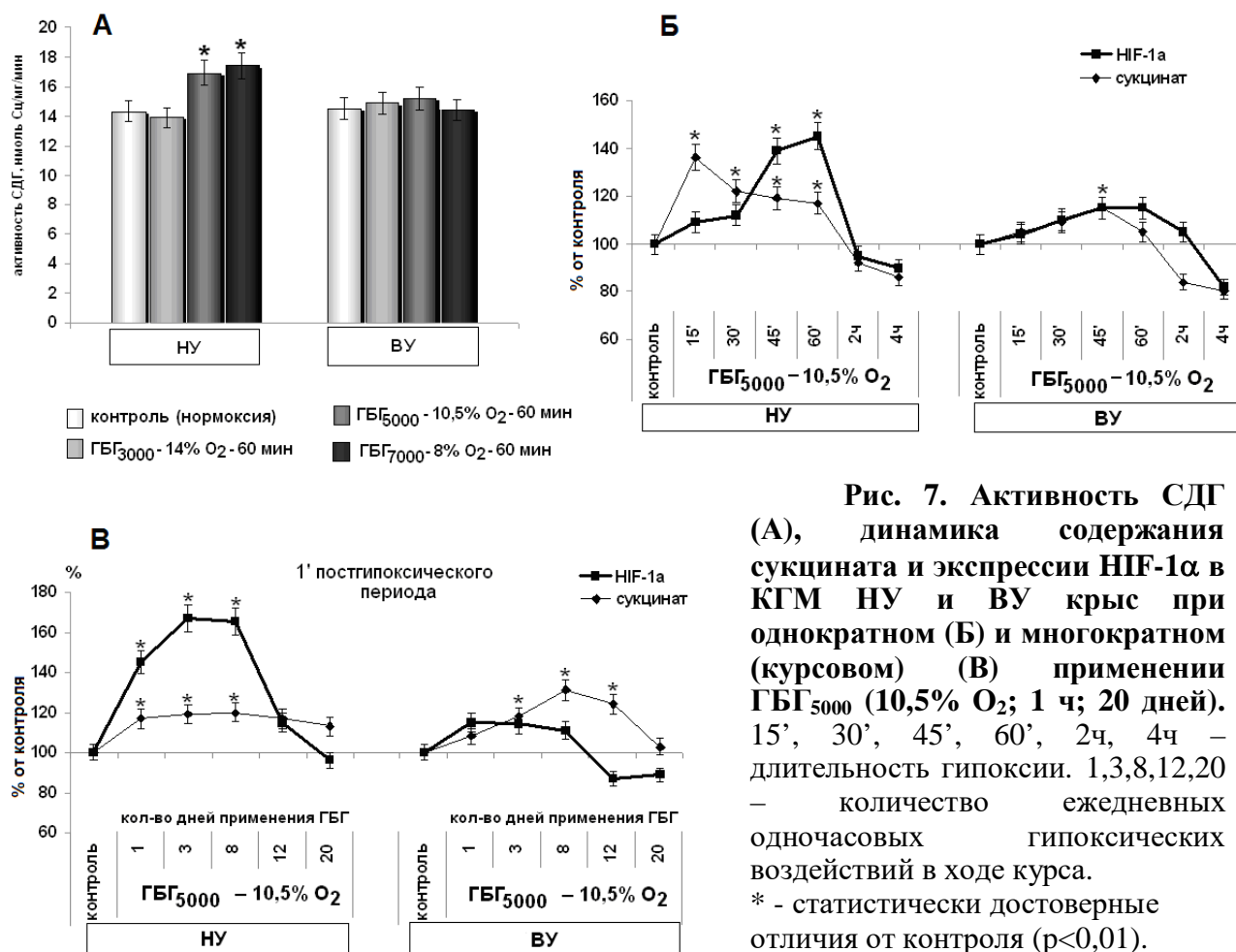
Для изучения регуляторной связи между содержанием HIF-1 $\alpha$  в клетке, состоянием дыхательной цепи и ролью сукцината в этом процессе нами было проведено сравнительное определение базового содержания сукцината в различных тканях НУ и ВУ крыс, которое показало отсутствие корреляции между его уровнем, количеством СДГ и содержанием HIF-1 $\alpha$ . И только КГМ характеризовалась высоким уровнем как HIF-1 $\alpha$ , так и эндогенного сукцината (табл. 2), что предполагает существование специфических для мозга метаболических путей его продукции. Источниками сукцината в КГМ могут быть ЦТК и специфичный для мозга ГАМК-шунт.

Таблица 2. Базовое (в условиях нормоксии) содержание янтарной кислоты (мкмоль/г сырого веса) в тканях НУ и ВУ крыс.

органы	сукцинат, мкмоль/г веса ткани	
	НУ (n=5)	ВУ (n=5)
печень	0,824 $\pm$ 0,048	0,819 $\pm$ 0,050
тестисула	0,776 $\pm$ 0,045	0,809 $\pm$ 0,051
кора головного мозга	0,723 $\pm$ 0,048	0,869 $\pm$ 0,056 <sup>#</sup>
поджелуд. железа	0,719 $\pm$ 0,042	0,743 $\pm$ 0,049
селезенка	0,423 $\pm$ 0,026	0,466 $\pm$ 0,029
почка	0,416 $\pm$ 0,027	0,395 $\pm$ 0,024
тимус	0,369 $\pm$ 0,022	0,371 $\pm$ 0,025
легкое	0,332 $\pm$ 0,021	0,341 $\pm$ 0,024
сердце	0,314 $\pm$ 0,019	0,323 $\pm$ 0,022
прямая мышца бедра	0,256 $\pm$ 0,017	0,241 $\pm$ 0,013

# - статистически достоверные различия между фенотипами ( $p < 0,05$ ).

Однократное гипоксическое воздействие «средней тяжести» (ГБГ<sub>5000</sub>, 10,5% O<sub>2</sub>) приводило к увеличению уровня сукцината и индукции HIF-1 $\alpha$  в КГМ НУ крыс. При этом наблюдалась и активация СДГ (МФК II) (рис. 7 А,Б). В отличие от НУ животных, в КГМ ВУ крыс индуцируемые гипоксией изменения в содержании сукцината и HIF-1 $\alpha$  были слабо выражены или недостоверны, а активация СДГ отсутствовала (рис. 7 А,Б).

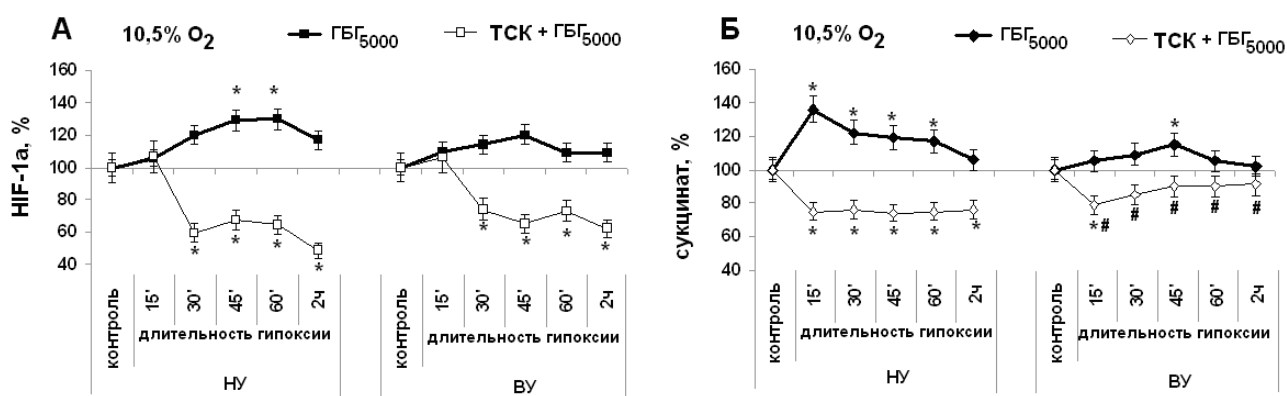


При курсовом применении гипоксии каждое очередное ее воздействие также сопровождалось увеличением содержания сукцината в КГМ НУ крыс, коррелирующим с экспрессией HIF-1 $\alpha$  (рис. 7В).

Полученные результаты являются прямым подтверждением возможности активации сукцинатоксидазного окисления в условиях гипоксии (репрограммирование работы дыхательной цепи) и сопряженного усиления образования сукцината, потенцирующего стабилизацию HIF-1 $\alpha$ .

ГАМК-шунт или цикл Робертса (Roberts E., Frankel S., 1950) является специфическим механизмом продукции нейромедиаторов – глутамата и ГАМК - в мозге, активируемым при различных видах стресса и, прежде всего, при гипоксии (McKhann G.M. et al., 1960; Wood J.D., Watson W.J., 1963) и необходимым для поддержания энергетического метаболизма мозга в экстремальных условиях (Roberts

E. et al., 1958; Wilson W.E. et al., 1959). Последнее может быть связано с образованием в его реакциях сукцината, который используется в качестве субстрата при гипоксической активации МФК II. В связи с этим закономерен вопрос: сопряжен ли ГАМК-шунт с сукцинатзависимой экспрессией HIF-1 $\alpha$ ? Проведенные эксперименты позволили получить положительный ответ на этот вопрос. Введение животным тиосемикарбазида (ТСК) – ингибитора одного из начальных ферментов этого метаболического пути глутаматдекарбоксилазы – сопровождалось снижением содержания сукцината и HIF-1 $\alpha$  в КГМ обоих фенотипов крыс (рис. 8). Эти данные свидетельствуют о том, что сукцинат, продуцируемый в цикле Робертса, участвует в формировании срочной гипоксической экспрессии HIF-1 $\alpha$  в КГМ НУ и ВУ крыс.



**Рис. 8.** Влияние тиосемикарбазида (ТСК; ингибитор глутаматдекарбоксилазы; 1 мг/кг; в/б; за 30 мин до гипоксии) на экспрессию HIF-1 $\alpha$  (А) и содержание сукцината (Б) в КГМ НУ и ВУ крыс в условиях ГБГ<sub>5000</sub> (10,5% O<sub>2</sub>) (в % от контроля).

\* - данные статистически достоверно отличаются от контроля ( $p < 0,01$ ).

# - статистически значимые различия между фенотипами ( $p < 0,05$ ).

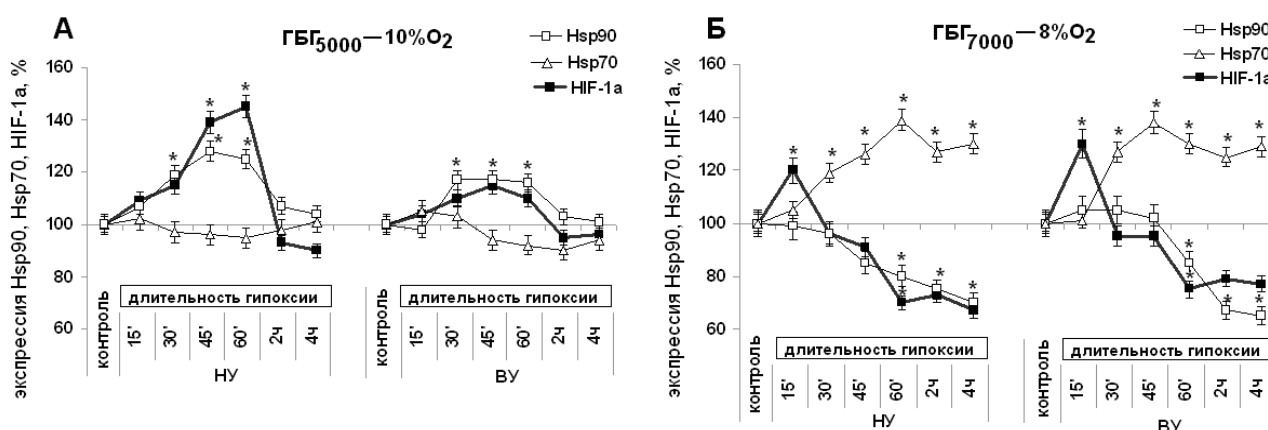
Таким образом, в условиях *in vivo* срочная сукцинатзависимая экспрессия HIF-1 $\alpha$  при гипоксии контролируется в КГМ по крайней мере двумя различными механизмами образования эндогенного сукцината, выполняющего сигнальную функцию: а) в цикле Кребса при активации СДГ и б) за счет функционирования специфического для мозга ГАМК-шунта, обеспечивающего в этих условиях дыхательную цепь сукцинатом.

В связи с полученными данными следует отметить различную активность ГАМК-шунта в КГМ двух фенотипов животных: оказалось, что его функционирование в условиях гипоксии на фоне предварительного введения животным ТСК (20 мг/кг, в/б, за 30 мин до гипоксии) и сопряженное образование сукцината у ВУ крыс сохранялось в 6 раз дольше, а отрицательное влияние гипоксии было выражено слабее, чем у НУ крыс. Предположительно различия могут быть связаны с неодинаковой исходной активностью у животных глутаматдекарбоксилазы, которая подавляется при тяжелой гипоксии (Anju T.R. et al., 2010). Все это, в свою

очередь, еще раз подтверждает вывод о существовании различных механизмов формирования адаптивных реакций в КГМ НУ и ВУ животных.

Несмотря на полученные доказательства зависимости стабилизации и аккумуляции HIF-1 $\alpha$  в гипоксических условиях от сукцината остается открытым вопрос, является ли последний единственным фактором, ограничивающим деградацию HIF-1 $\alpha$ . В литературе имеются данные о взаимодействии белков теплового шока HSP90 и HSP70 с HIF-1 $\alpha$ , потенцирующем его активность и экспрессию (Isaacs J.S. et al., 2002; Katschinski D.M. et al., 2002, 2004; Semenza G.L., 2007; Xiong L. et al., 2009; Zhang D. et al., 2010).

В связи с изучением этого вопроса нами впервые было показано, что в условиях гипоксии (ГБГ<sub>5000</sub>-10,5%O<sub>2</sub>), максимально индуцирующей HIF-1 $\alpha$ , гипоксическая экспрессия HSP90 и HIF-1 $\alpha$  увеличивались сопряжено (рис. 9А). Эта зависимость была более выражена в КГМ НУ крыс и отсутствовала в постгипоксическом периоде. Экспрессия HSP70 в этих условиях не менялась, что указывает на отсутствие вовлеченности HSP70 в регуляцию гипоксической индукции HIF-1 $\alpha$ .



**Рис. 9.** Влияние ГБГ «средней тяжести» (А) и «тяжелой» ГБГ (Б) на экспрессию HSP90, HSP70 и HIF-1 $\alpha$  в КГМ НУ и ВУ крыс (в % от контроля). \* - статистически значимые отличия от контроля ( $p < 0,01$ ).

В условиях «тяжелой» гипоксии экспрессия HSP90 подавлялась в КГМ НУ и ВУ крыс, также как и экспрессия HIF-1 $\alpha$  (рис. 9Б). Известно, что в условиях тяжелой гипоксии и активации свободнорадикального окисления HSP90 подвергаются глутатионилированию с последующей деградацией в убиквитин-протеасомной системе (Beck R. et al., 2009; Shih Y.-Y., Lin C.-H., 2015). Следовательно, снижение содержания HSP90 при тяжелой гипоксии может быть причиной снижения уровня HIF-1 $\alpha$ .

Таким образом, при умеренной гипоксии в условиях *in vivo* в нейронах КГМ реализуется сложная, многокомпонентная система срочного регулирования стабильности HIF-1 $\alpha$ , включающая как образование сукцината, так и индукцию

HSP90, и обеспечивающая оптимальные условия для экспрессии HIF-1 $\alpha$ -зависимых адаптивных генов. Согласно нашим данным, такое взаимодействие возможно не только при длительном действии гипоксии, как следует из работ N.A. Baird et al. (2006) и Y.V. Liu et al. (2007). В КГМ оно проявляется с первых минут гипоксического воздействия, выражено сильнее у НУ крыс и перестает действовать в постгипоксическом периоде.

Известно, что симпатoadреналовая система принимает ведущее участие в формировании толерантности организма к гипоксии. Однако роль  $\beta$ -адренергической сигнализации в регуляции гипоксической экспрессии HIF-1 $\alpha$  практически не изучена.

Проведенные нами исследования с помощью неспецифического  $\beta$ -адреноблокатора соталола показали, что в условиях подавления  $\beta$ -адренергической сигнализации гипоксическая экспрессия HIF-1 $\alpha$  увеличивалась в КГМ двух фенотипов крыс почти в два раза (рис. 10). Следовательно, существует регуляторное взаимодействие между этими двумя системами: эффекты  $\beta$ -адренергической сигнализации направлены на ограничение гипоксической индукции HIF-1 $\alpha$ .

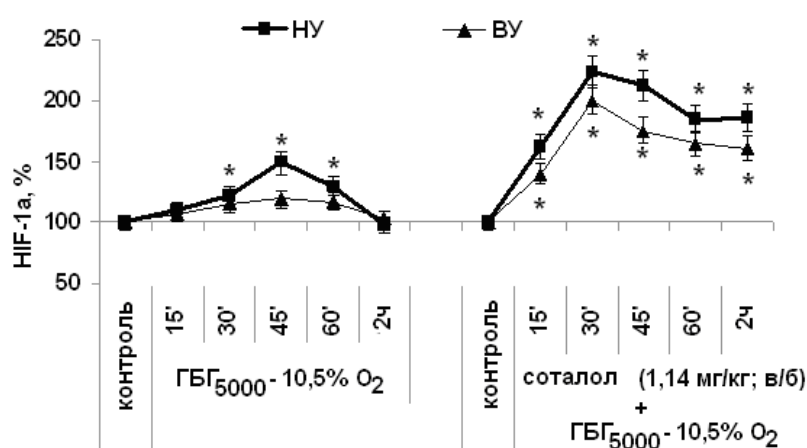


Рис. 10. Влияние  $\beta_{1/2}$ -адреноблокатора (соталол; 1,14 мг/кг; в/б; за 30 мин до гипоксии) на гипоксическую экспрессию HIF-1 $\alpha$  в КГМ НУ и ВУ крыс (в % от контроля).

\* - данные достоверно отличаются от контроля (p < 0,01).

Применение  $\beta$ -адреноблокаторов в условиях гипокситерапии открывает возможность направленного регулирования процессом формирования адаптивных признаков и модулирования активности HIF-1 $\alpha$ -зависимых реакций.

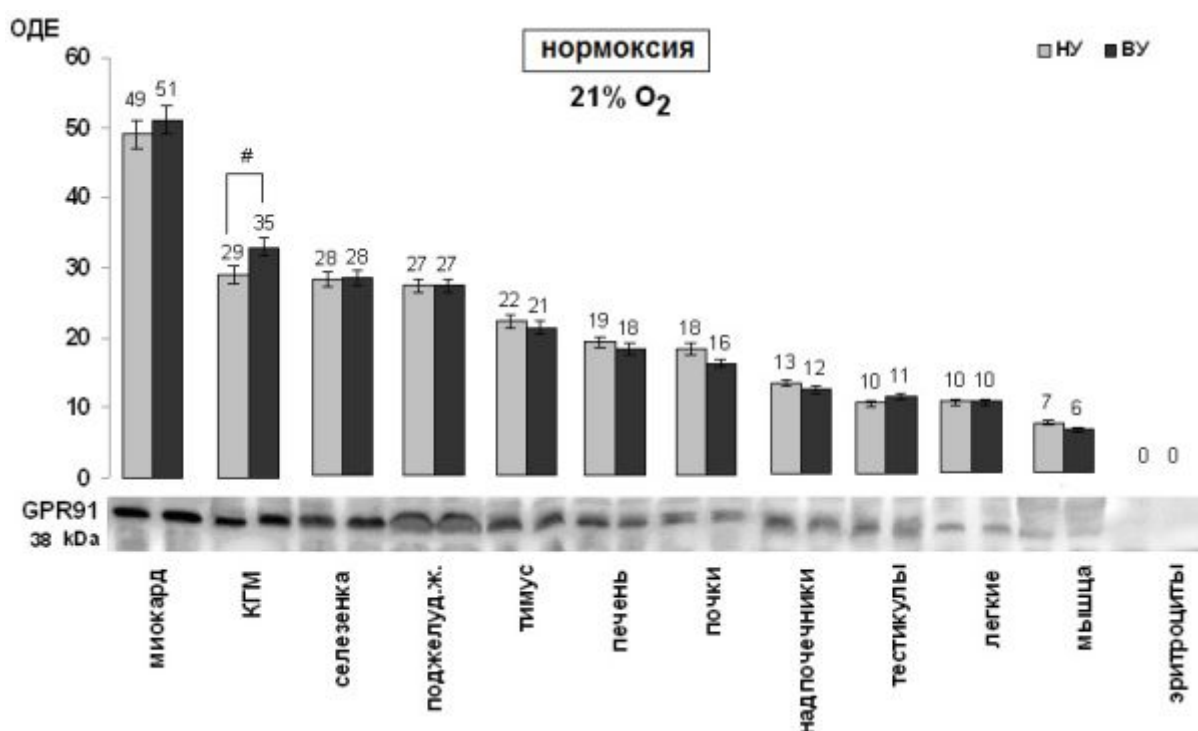
Таким образом, в целом доказано, что экспрессия HIF-1 $\alpha$  является сукцинатзависимым процессом, который потенцируется активацией СДГ при гипоксии, продукцией сукцината в цикле Робертса (ГАМК-шунт), гипоксической экспрессией HSP90 и ограничивается  $\beta$ -адренергической сигнализацией.

**Роль сукцинатного рецептора GPR91 в формировании механизмов адаптации к гипоксии.** Впервые полученные нами сравнительные данные о распределении рецептора в тканях животных с исходными индивидуальными различиями в толерантности к гипоксии позволили установить, что в условиях нормоксии наиболее высокая его плотность характерна для КГМ и миокарда – тканей с высокими уровнями экспрессии HIF-1 $\alpha$  (рис. 11). При этом базовое содержание



GPR91 в КГМ ВУ крыс, оцениваемое методами Вестерн-блот анализа (рис. 11) и иммуногистохимии, было значимо выше, чем у НУ, что коррелировало с достоверно более высоким содержанием сукцината (табл. 2) в этой ткани сравнительно с НУ животными. Эти данные позволяют предполагать особую функциональную значимость GPR91 в условиях нормоксии для КГМ ВУ крыс.

Предполагается, что причинами наблюдаемой гетерогенности уровней GPR91, СДГ и сукцината в разных тканях могут быть: а) тканеспецифические различия в интенсивности аэробного обмена и, следовательно, в содержании митохондрий, определяющих уровень СДГ; б) тканеспецифические различия в метаболических путях синтеза сукцината и его доступности для рецептора.



**Рис. 11. Базовое (в условиях нормоксии) содержание GPR91 в тканях НУ и ВУ крыс.** В условиях нормоксии GPR91 выявлялся во всех тестируемых тканях за исключением эритроцитов, не содержащих митохондрий. Максимальный уровень GPR91 был обнаружен в миокарде и КГМ. Содержание GPR91 в КГМ ВУ крыс было достоверно выше по сравнению с НУ крысами. ОДЕ – относительные денситометрические единицы. # - различия между фенотипами ( $p < 0,05$ ).

Иммуногистохимическое определение GPR91 в срезах префронтальной КГМ позволило установить, что в нормоксических условиях общее количество GPR91-экспрессирующих клеток не отличалось у НУ и ВУ крыс, однако уровень экспрессии GPR91 в нервных клетках ВУ животных был достоверно более высоким сравнительно с НУ. Наибольшее количество GPR91-экспрессирующих клеток в префронтальной коре НУ и ВУ крыс относятся к двум типам: крупным нейронам площадью 400-100  $\mu\text{m}^2$  (39-43% от общего числа клеток) и клеткам (предположительно глиальным) размером 50-10  $\mu\text{m}^2$  (41-43%). Данные свидетельствуют о том, что в КГМ с активностью GPR91 сопряжены функционально различные клеточные популяции.

Экзогенный сукцинат, введенный животным *in vivo* в нормоксических условиях (в виде сукцинатсодержащего препарата мексидола - 40 мг/кг, в/б), способствовал увеличению плотности GPR91 в КГМ крыс, т.е. выполнял роль лиганда этого рецептора. Индуцированное мексидолом увеличение плотности GPR91 имело устойчивый характер и сохранялось в течение суток. Для достижения максимально высокой плотности GPR91 в нормоксических условиях необходимо от 3-х до 8 инъекций мексидола.

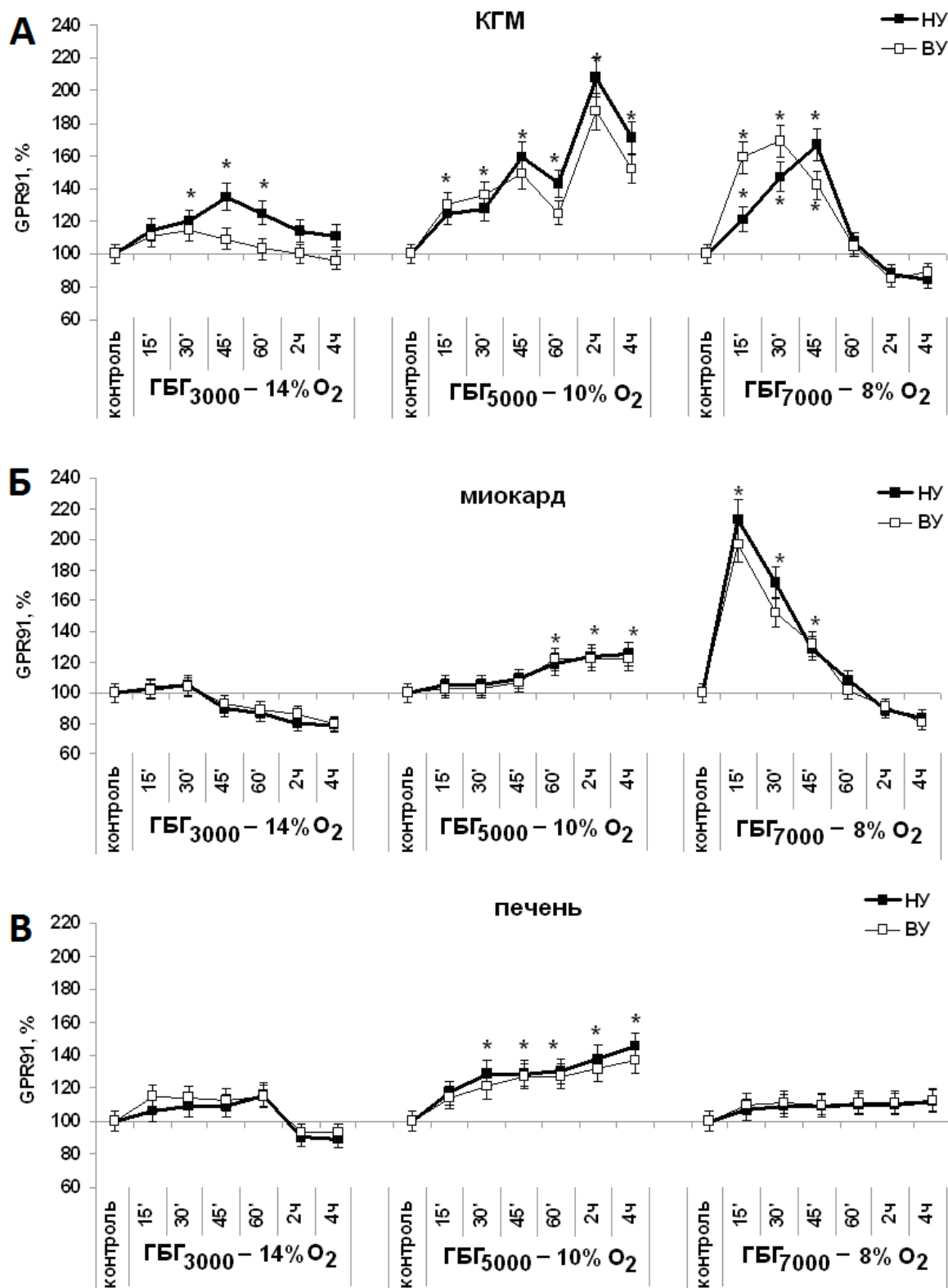
Изучение влияния гипоксии на индукцию GPR91 проводили на трех тканях – КГМ, миокарде и печени. В ответ на *однократное гипоксическое воздействие* наблюдалось срочное увеличение плотности GPR91 во всех исследованных тканях (КГМ, сердце, печень) и этот процесс был тканеспецифичным, зависел от силы и длительности гипоксического воздействия и по интенсивности не коррелировал с базовым уровнем рецептора.

Определение коэффициента корреляции между содержанием сукцината и плотностью GPR91 при гипоксии показало, что в первые 30 мин степень сопряженности между этими двумя процессами была очень высокой ( $r > +0,9$ ), но ослабевала при более продолжительном действии гипоксии.

При воздействии самого мягкого режима гипоксии (ГБГ<sub>3000</sub>, 14% O<sub>2</sub>) срочная гипоксическая экспрессия GPR91 наблюдалась только в КГМ НУ крыс (рис. 12А). Однако она развивалась во всех исследованных тканях (рис. 12 А,Б,В) в условиях гипоксии «средней тяжести» (ГБГ<sub>5000</sub>, 10,5% O<sub>2</sub>), имела короткий латентный период (менее 15 мин в КГМ, до 45 мин в миокарде) и достигала максимальных значений через 45-60 мин. При этом плотность GPR91 в КГМ НУ и ВУ крыс увеличивалась двукратно, в то время как в других тестируемых тканях (миокард, печень) не превышала 120-130%, что свидетельствует об особой значимости рецептора в функциональной активности мозга при гипоксии. Индукция GPR91 в этих условиях совпадала по времени с периодом формирования срочной резистентности организма к гипоксии, что подтверждает правильность используемого нами временного режима при гипоксических воздействиях (1 ч).

Тяжелая гипоксия сопровождалась самой интенсивной индукцией GPR91 (150-180%) в КГМ двух фенотипов крыс. В миокарде индукция GPR91 была менее продолжительной, а в печени она отсутствовала (рис. 12 А,Б,В).

Таким образом, в КГМ обоих фенотипов, в отличие от других тестируемых тканей, гипоксическая индукция GPR91 проявлялась в более широком диапазоне сниженных концентраций кислорода (от пороговых до повреждающих: ГБГ, 14-8% O<sub>2</sub>), коррелировала с увеличением уровня сукцината в ткани и была более выражена у НУ животных, что может отражать высокую чувствительность мозга к снижению уровня кислорода и вовлеченность рецептора в формирование адаптивных реакций этой ткани к гипоксии.



**Рис. 12.** Влияние однократного воздействия разных режимов ГБГ на экспрессию GPR91 в КГМ (А), сердце (Б), печени (В) НУ и ВУ крыс. Представлены результаты количественного анализа репрезентативных иммуноблотов (в % от контроля). \* - данные статистически достоверно отличаются от контроля ( $p < 0,05$ ).

При курсовом применении гипоксии плотность GPR91 в КГМ постепенно увеличивалась по мере увеличения количества гипоксических воздействий, достигая максимальных значений после 8-12 воздействий (рис. 13А). Наиболее выраженное увеличение плотности рецептора наблюдали при ГБГ «средней тяжести» (150-170%), наименее выраженное - при «тяжелой гипоксии» (120-130%). Достоверные фенотипические различия отсутствовали (рис. 13 А).

В отличие от КГМ, увеличение плотности GPR91 в сердце и печени НУ и ВУ крыс наблюдалось только при курсовом применении ГБГ *средней* тяжести (рис. 13 Б,В). Курсовое применение *тяжелой* ГБГ вызывало снижение плотности GPR91 в сердце и печени обоих типов крыс, которое усиливалось по мере увеличения числа гипоксических воздействий. Таким образом, гипоксические воздействия «средней тяжести» (ГБГ<sub>5000</sub>-10,5% O<sub>2</sub>) являются наиболее эффективными для индукции GPR91 во всех тестируемых органах крыс.

GPR91 может индуцировать HIF-1–независимую экспрессию VEGF и ангиогенез (Arany Z. et al., 2008; Caprara C. et al., 2011; Sapieha P., 2012; Sapieha P. et al., 2008), что является одним из доказательств вовлечения рецептора в адаптивные процессы. В связи с этим нами было проведено исследование возможности взаимодействия GPR91 и VEGF. Оказалось, что введение в нормоксических условиях сукцинатсодержащего препарата мексидола (40 мг/кг; в/б; 12 ежедневных инъекций) вызывало в КГМ обоих фенотипов крыс не только увеличение плотности GPR91, но и сопряженное увеличение экспрессии VEGF. Содержание HIF-1 $\alpha$  в этих условиях не менялось, что доказывает возможность GPR91-зависимой и сукцинатзависимой индукции VEGF в КГМ НУ и ВУ крыс и регуляторного влияния рецептора на ангиогенез.

В условиях гипоксии «средней тяжести», как при однократном, так и при курсовом ее применении, была выявлена сильная положительная корреляция между динамикой экспрессии GPR91 и VEGF в КГМ НУ и ВУ крыс. Изменения плотности GPR91 происходили в гораздо более широком диапазоне концентраций кислорода во вдыхаемом воздухе, чем экспрессия VEGF. Оптимальными условиями для индукции последней является режим ГБГ<sub>5000</sub> (10,5% O<sub>2</sub>). Индукция VEGF отсутствовала как при более высоких значениях O<sub>2</sub>, так и при более низких («тяжелая» гипоксия), способствующих развитию повреждающих эффектов. Гипоксическая индукция VEGF выявлялась всегда позже, чем происходило увеличение уровня GPR91. Таким образом, индукция GPR91 может инициировать индукцию VEGF в КГМ НУ и ВУ крыс лишь в ограниченном диапазоне концентраций кислорода, при умеренных гипоксических воздействиях.

Таким образом, GPR91 вовлекается в формирование адаптивных механизмов как у НУ, так и у ВУ крыс.

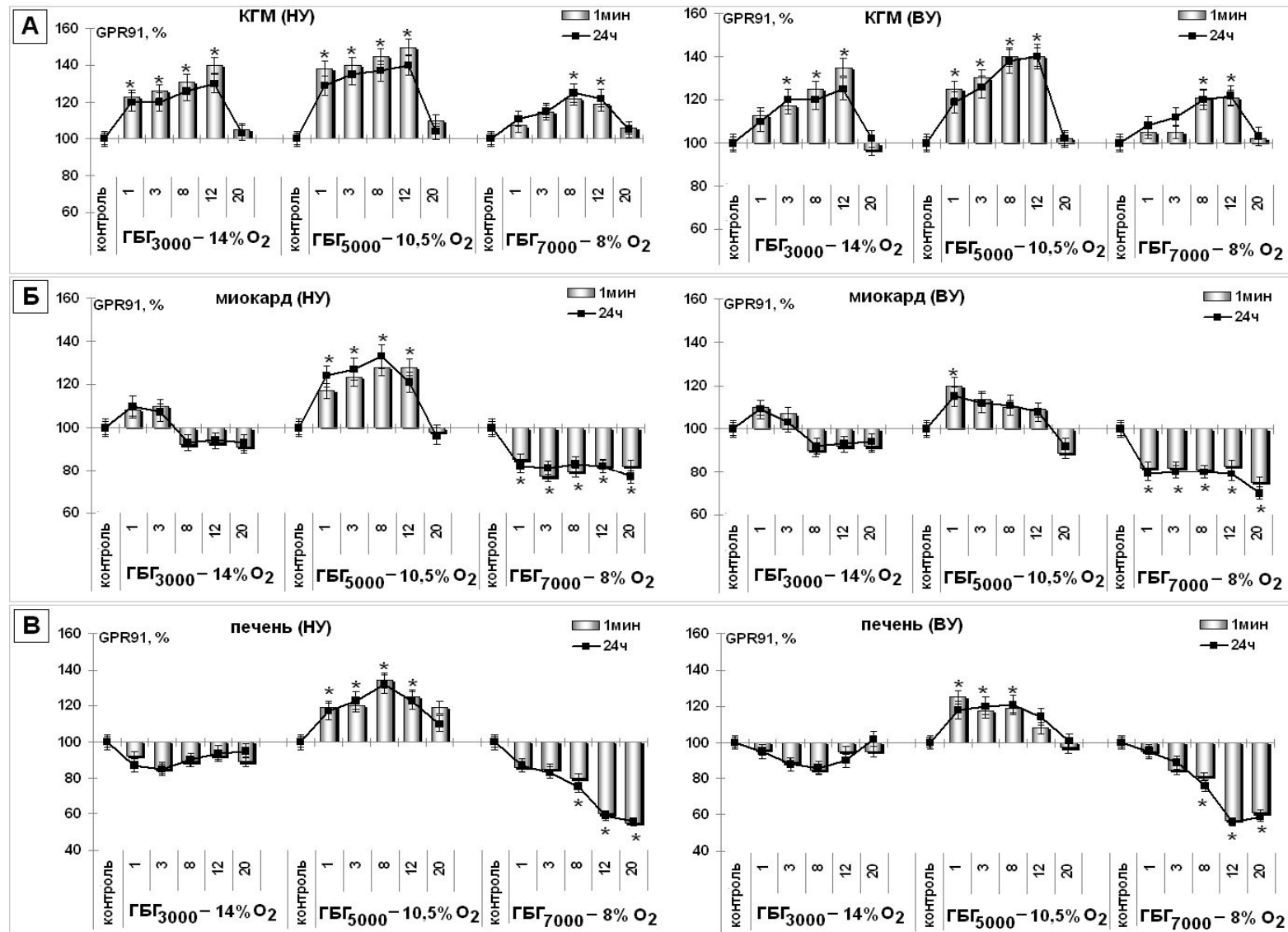
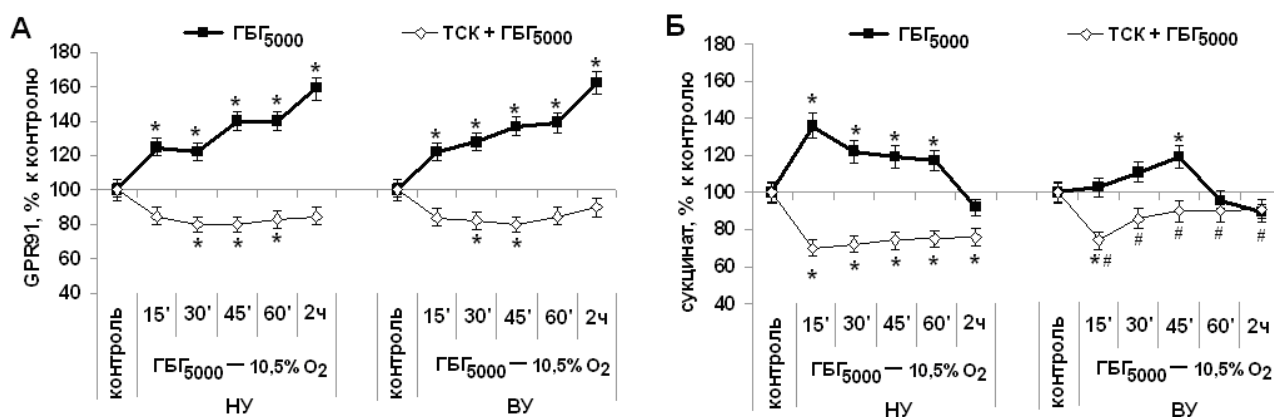


Рис. 13. Влияние многократного (курсового) применения разных режимов ГБГ на экспрессию GPR91 в КГМ (А), миокарде (Б), печени (В) НУ и ВУ крыс (в % от контроля). 1 мин, 24 ч – продолжительность постгипоксического периода. \* - данные статистически достоверно отличаются от контроля ( $p < 0,05$ ).

При изучении механизмов, контролируемых срочную сукцинатзависимую гипоксическую индукцию GPR91, нами было показано, что главным источником сукцината для GPR91 в КГМ является ГАМК-шунт (цикл Робертса), активирующийся при гипоксии и способствующий образованию сукцината.

Определяющая роль сукцината в индукции GPR91 была подтверждена в экспериментах по блокированию перед гипоксическим воздействием ГАМК-шунта тиосемикарбазидом, что вызывало достоверное снижение содержания сукцината и экспрессии GPR91 в КГМ НУ и ВУ крыс (рис. 14).



**Рис. 14.** Влияние тиосемикарбазида (ингибитора глутаматдекарбоксилазы) на гипоксическую экспрессию GPR91 (А) и продукцию сукцината (Б) в цикле Робертса. ТСК – тиосемикарбазид (1 мг/кг; в/б; за 30 мин до гипоксии). \* - данные статистически достоверно отличаются от контроля ( $p < 0,01$ ). # - достоверные отличия между фенотипами ( $p < 0,05$ ).

Ингибирование СДГ в условиях гипоксии с целью определения зависимости уровня GPR91 от сукцитнатоксидазного окисления конкурентным ингибитором этого фермента малонатом (*in vivo*, 40 мг/кг; в/б; за 30 мин до ГБГ<sub>5000</sub>-10,5% O<sub>2</sub>) приводило не к снижению, как в случае с NIF-1 $\alpha$ , а увеличению плотности рецептора в КГМ, коррелирующему с увеличением содержания сукцината (рис. 15). Таким образом, срочная экспрессия GPR91 в КГМ не зависит от активности МФК II и поддерживается сукцинатом, образованным в реакциях ГАМК-шунта.

Принимая во внимание сверхсрочный характер индукции GPR91 в КГМ НУ и ВУ крыс, а также вовлеченность  $\beta$ -адренергической регуляции в формирование срочных компенсаторно-приспособительных реакций мозга при гипоксическом стрессе (Кондрашова М.Н., 1989, 2000; Edwards D.J. et al., 1989; Lenard N.R. et al., 2003; Li J. et al., 2010; Takao Y. et al., 1992), было проведено исследование зависимости гипоксической индукции GPR91 от  $\beta$ -адренергической сигнализации. Полученные нами данные подтверждают существование регуляторного взаимодействия между адренергической сигнальной системой и GPR91, более выраженное у НУ крыс. В условиях гипоксии «средней тяжести» на фоне неспецифического  $\beta_{1/2}$ -адреноблокатора соталола содержание сукцината и плотность

GPR91 в КГМ двух фенотипов крыс снижались уже через 15 мин после начала гипоксического воздействия и этот эффект сохранялся на протяжении последующих 2-х часов (рис. 16).

Таким образом, активация адренергической системы увеличивает плотность GPR91 через увеличение содержания сукцината в нейронах.

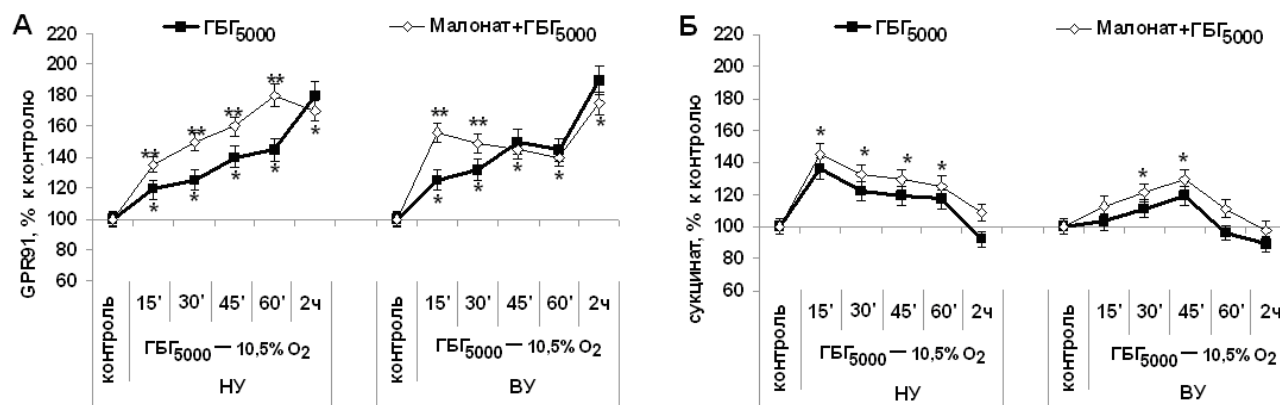


Рис. 15. Влияние ингибитора сукцинатдегидрогеназы (СДГ) малоната (40 мг/кг; в/б; за 30 мин до гипоксии) на экспрессию GPR91 (А) и содержание сукцината (Б) в КГМ НУ и ВУ крыс в условиях ГБГ<sub>5000</sub> (10,5% O<sub>2</sub>). \* - данные отличаются от контроля (p<0,01). \*\* - данные отличаются между опытными группами (ГБГ<sub>5000</sub> и малонат+ГБГ<sub>5000</sub>) (p<0,05).

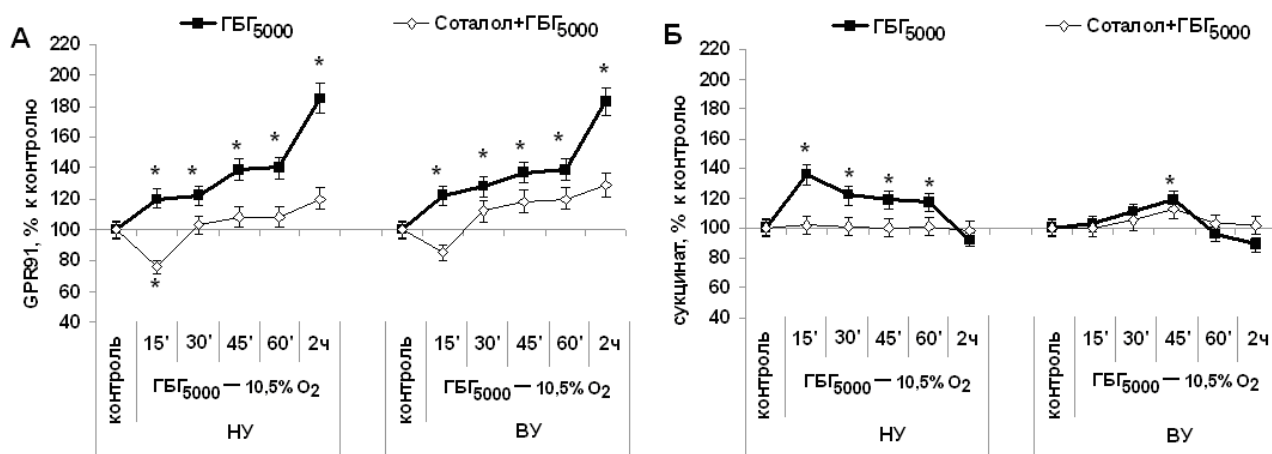


Рис. 16. Влияние соталола ( $\beta_{1/2}$ -адреноблокатор; 1,14 мг/кг, в/б за 30 мин до гипоксии) на экспрессию GPR91 (А) и продукцию сукцината (Б) в КГМ НУ и ВУ крыс в условиях ГБГ<sub>5000</sub> (10,5% O<sub>2</sub>). \* - данные отличаются от контроля (p<0,01).

Резюмируя вышеизложенное можно заключить: метаботропный сукцинатный рецептор GPR91 может рассматриваться как триггерный (индуцируется при гипоксии раньше срочной гипоксической экспрессии HIF-1 $\alpha$ ), универсальный (не зависит от базовой устойчивости к гипоксии) механизм, потенцируемый сигнальной молекулой сукцинатом, эффекты которого реализуются по типу аутокринного сигнала, и  $\beta$ -адренергической системой и вовлекаемый в формирование срочных и отсроченных адаптивных реакций.

Учитывая, что активация GPR91 сукцинатом инициирует сигнальный каскад через Gq- и Gi-опосредованные пути, которые индуцируют внутриклеточную мобилизацию Ca<sup>2+</sup>, увеличение содержания инозитол-3-фосфата, активацию ERK1/2, ингибирование аккумуляции цАМФ (He W. et al., 2004; Komers R. et al., 2007; Tian W. et al., 2000; Vargas S.L. et al., 2009), система сукцинат-GPR91 может функционировать как более чувствительный сенсор гипоксии, чем HIF-1 $\alpha$  и содействовать в ткани мозга высвобождению концентраций проангиогенных факторов, точно соответствующих эффективно повышению регионарного кровообращения и преодолению энергетического дисбаланса (Sapieha P., 2012).

**Влияние разных режимов ГБГ на содержание компонентов пула глутатиона, продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в КГМ.** Значимость данного раздела исследований определяется тем, что HIF-1 $\alpha$  и GPR91 содержат легко окисляющиеся тиоловые группы и являются редокс-чувствительными белками (Carrero P. et al., 2000; Haddad J.J., 2002; Rosenbaum D.M. et al., 2009; Strange P.G., 1999). Активность этих систем зависит от редокс-статуса ткани, содержания восстановленного глутатиона (GSH), активности ферментов глутатионового цикла: глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР).

В представленной работе впервые было проведено многопараметрическое исследование активности системы глутатиона и сопряженных редокс-процессов в КГМ НУ и ВУ крыс – ткани с высоким базовым содержанием и интенсивной гипоксической индукцией исследуемых факторов (HIF-1 $\alpha$  и GPR91) – в условиях нормоксии и при воздействии разных режимов гипоксии, а также анализ зависимости гипоксической индукции HIF-1 $\alpha$  и GPR91 от изменений редокс-статуса КГМ.

В условиях *нормоксии* базовое редокс-состояние КГМ различается у двух фенотипов крыс. Для КГМ ВУ крыс характерна более высокая, чем в КГМ НУ животных, интенсивность процессов свободнорадикального и перекисного окисления, о чем свидетельствовал более высокий уровень гидроперекисных метаболитов (общий пул H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и органических гидропероксидов; ROOH) и окисленного глутатиона (GSSG) (табл. 3, 4). Активность ферментов системы глутатиона (ГПО, ГР) и каталазы также была достоверно выше по сравнению с НУ крысами (табл. 3). Более высокая активность ГПО в КГМ ВУ крыс может отражать лучшую оксигенцию мозга этих животных сравнительно с НУ крысами, поскольку экспрессия цитоплазматической изоформы ГПО (ГПО1) кислородзависима.



**Таблица 3. Содержание компонентов пула глутатиона (G, GSH, GSSG), активность ферментов цикла глутатиона (ГПО, ГР) и глутатион-независимых антиоксидантных ферментов в КГМ НУ и ВУ крыс в условиях нормоксии.**

КГМ	Параметры пула глутатиона				Ферменты цикла глутатиона		Антиоксидантные ферменты	
	G	GSH	GSSG	GSH/GSSG	ГПО	ГР	Cu,Zn-СОД	Каталаза
	мкмоль/г сырого веса ткани				нмоль НАДФН/мин/мг белка		усл.ед/мг белка	нмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мин /мг белка
НУ	2,86 ± 0,14	2,51 ± 0,13	0,314 ± 0,011	8,15 ± 0,33	29,10 ± 1,59	29,37 ± 1,49	31,02 ± 1,51	1,84 ± 0,07
ВУ	2,90 ± 0,18	2,54 ± 0,16	0,388 ± 0,014 #	6,65 ± 0,29 #	46,6 ± 2,41 #	42,68 ± 2,26 #	23,88 ± 1,05 #	2,47 ± 0,12 #

# - статистически достоверные отличия между фенотипами.

**Таблица 4. Содержание гидроперекисных метаболитов и продуктов перекисного окисления липидов в КГМ и сыворотке НУ и ВУ крыс в условиях нормоксии.**

Продукты ПОЛ	КГМ			сыворотка крови		
	ГП (ROOH)	ДК	ТБК-РП	ГП (ROOH)	ДК	ТБК-РП
	экв. КГП /г ткани	нмоль/г сырого веса ткани		экв. КГП /мл	нмоль/мл	
НУ	48,20 ± 2,15	21,51 ± 1,16	257 ± 14,1	8,6 ± 0,39	4,54 ± 0,24	11,56 ± 0,65
ВУ	61,85 ± 2,69 #	24,25 ± 1,26	286 ± 16,4	9,8 ± 0,54	5,31 ± 0,31	11,95 ± 0,62

# - статистически достоверные отличия между фенотипами. (КГП – гидропероксид кумена).

Ген ГПО1 содержит два  $O_2$ -зависимых элемента, которые активируют транскрипцию при увеличении уровня  $O_2$  в клетке (Merante F. et al., 2002). Более высокая оксигенация КГМ ВУ крыс в нормоксических условиях, в свою очередь, может определять более высокий уровень окислительного метаболизма и свободнорадикальной активности в этой ткани.

Активность  $H_2O_2$ -продуцирующего фермента Cu,Zn-СОД в КГМ ВУ крыс была снижена по сравнению с НУ животными (табл. 3). Известно, что Cu,Zn-СОД ингибируется продуктом реакции (пероксидом водорода) и, таким образом, снижение активности этого фермента в КГМ ВУ крыс, у которых повышен базовый уровень гидроперекисей, может служить маркером дисбаланса  $H_2O_2$ -продуцирующих и  $H_2O_2$ -элиминирующих ферментных систем (Bray R.C., Cockle S.A., 1974; Choi J. et al., 2005; Hodgson E.K., Fridovich I., 1975; Pigeolet E. et al., 1990). Таким образом, в условиях *нормоксии* в КГМ ВУ крыс наблюдается более интенсивная продукция  $H_2O_2$  – основного компонента пула гидроперекисей.

Все эти различия свидетельствуют о сдвиге редокс-равновесия в КГМ ВУ крыс в нормоксических условиях в сторону большей окисленности по сравнению с НУ. Более высокая интенсивность процессов свободнорадикального и перекисного окисления в КГМ ВУ крыс может быть связана с более высоким базовым содержанием норадреналина и адреналина (соответственно в 2,9 и 4,7 раза выше, чем у НУ) (Лукьянова Л.Д., 2004) и гиперактивацией продукции АФК, опосредованной  $\beta_2$ -адренорецепторами (Li J. et al., 2010; Moniri N.H., Daaka Y., 2007; Xu Q. et al., 2011). Кроме того, окислительный метаболизм (аутоокисление) катехоламинов, интенсивность которого выше в КГМ ВУ крыс, может способствовать активации свободнорадикальных процессов (Bindoli A. et al., 1992; Gotz M.E. et al., 1994; Graham D.G., 1984; Rosenberg P.A., 1988).

Таким образом, в условиях нормоксии в КГМ НУ крыс более сбалансированное соотношение активности про- и антиоксидантных систем было сопряжено с более высоким уровнем экспрессии NIF-1 $\alpha$  (в 1,5-1,7 раз выше по сравнению с ВУ), который может вовлекаться в регуляцию редокс-статуса клетки. NIF-1 $\alpha$  модулирует функциональную активность митохондрий – главного источника АФК, подавляет биогенез митохондрий, индуцирует митофагию (Kim J.W. et al., 2006; Zhang H. et al., 2007). Все эти процессы обеспечивают проявление его протективных свойств, ограничивающих гиперактивацию свободнорадикального окисления в условиях нормоксии, при гипоксии и реоксигенации.

Реакция системы глутатиона и ПОЛ в КГМ НУ и ВУ крыс на *разные режимы гипоксии* зависела от тяжести воздействия.

Характерным для *однократного наиболее мягкого неповреждающего гипоксического воздействия* (ГБГ<sub>3000</sub>, 14%  $O_2$ , 1ч) являлось кратковременное увеличение восстановленности в КГМ (уменьшение содержания GSSG, увеличение отношения GSH/GSSG), более выраженное у НУ животных и сопряженное со снижением уровня гидроперекисных метаболитов (рис. 17 А,Б).

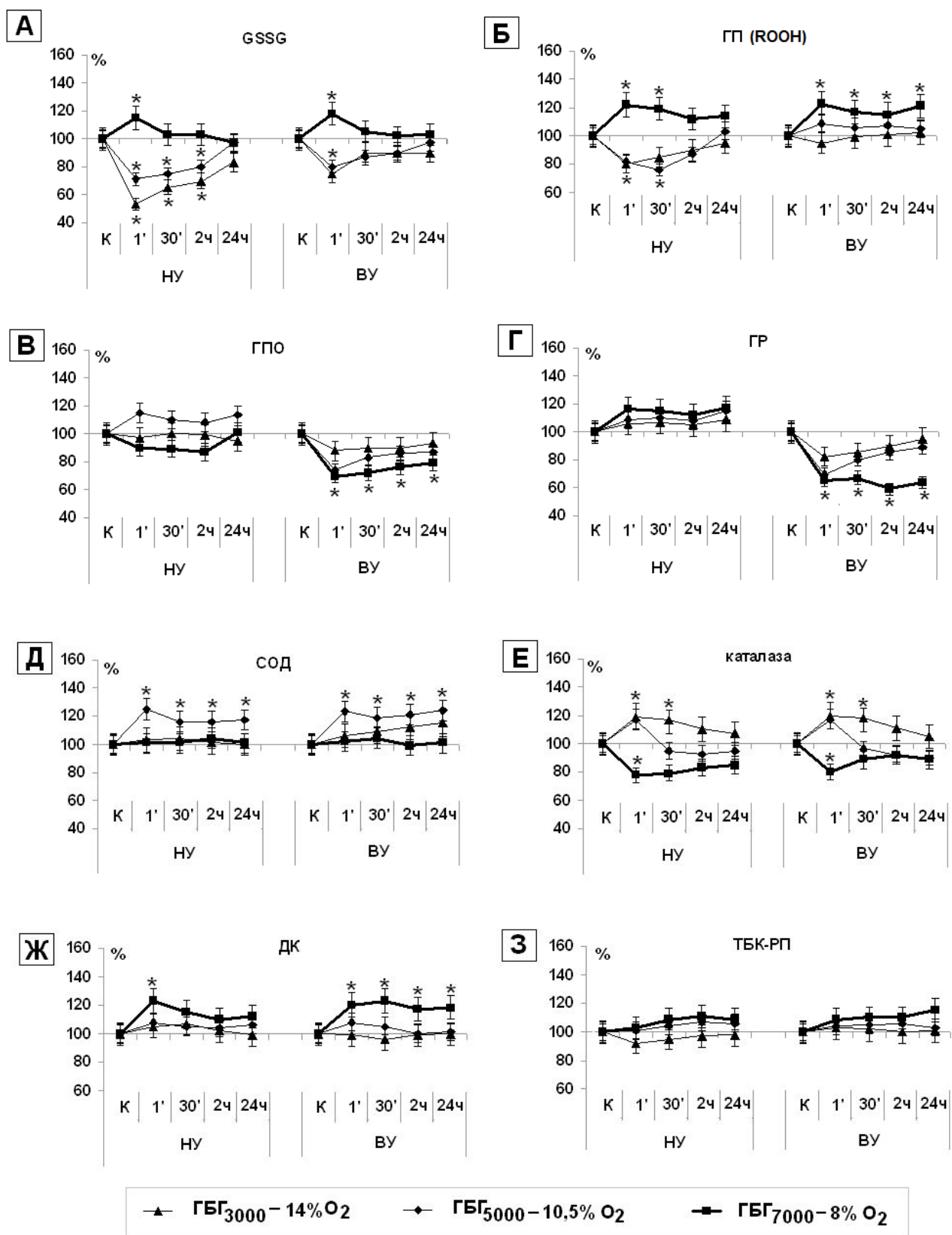


Рис. 17. Влияние однократного применения разных режимов ГБГ (продолжительностью 1ч) на активность антиоксидантных ферментов, содержание GSSG, гидроперекисей и продуктов ПОЛ в КГМ НУ и ВУ крыс (в % от контроля). К – контроль. 1', 30', 2ч, 24ч – продолжительность постгипоксического периода. \* – статистически достоверные отличия от контроля ( $p < 0,05$ ).

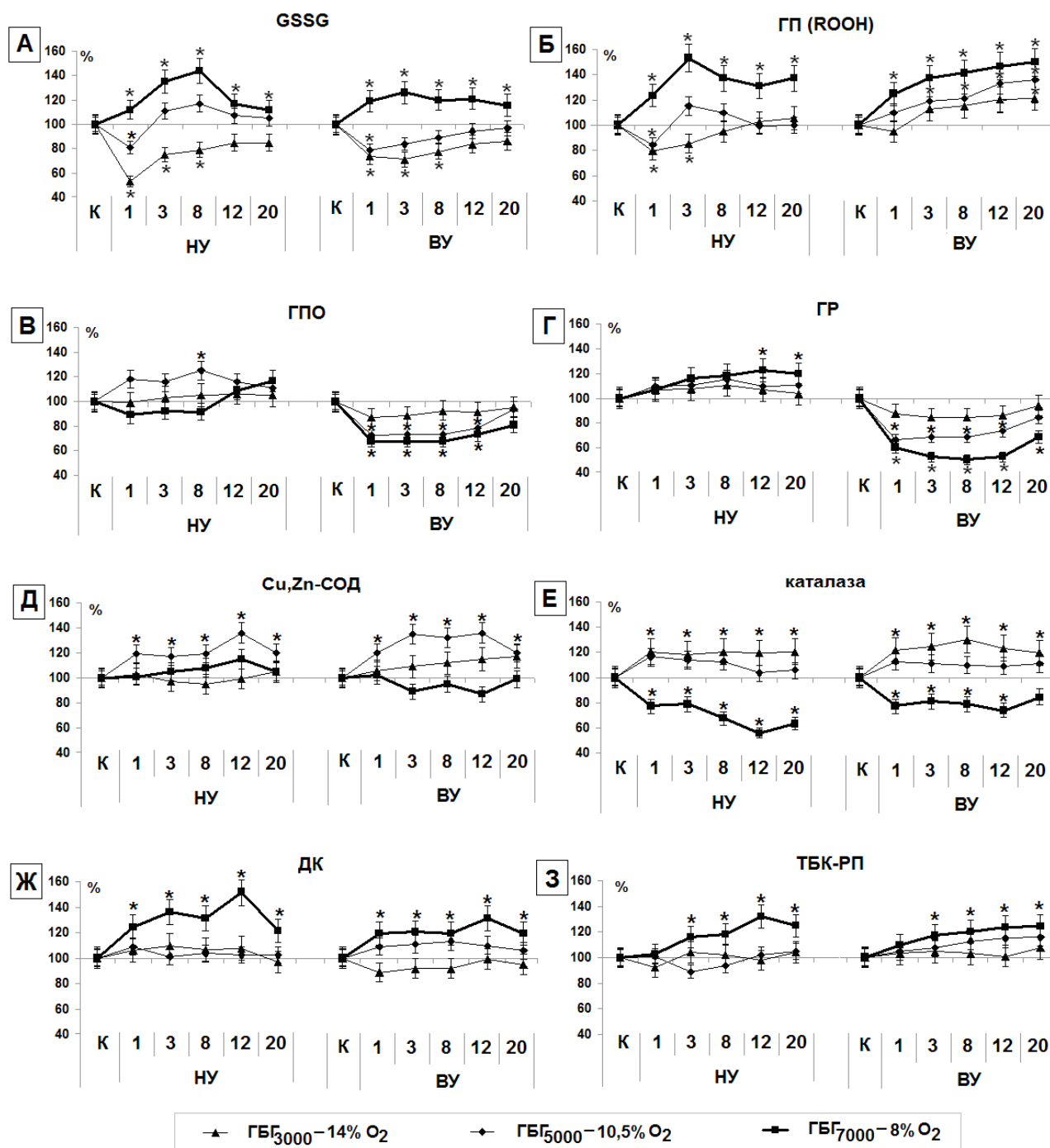
Снижение уровня GSSG и гидроперекисей в условиях «слабой» гипоксии может отражать, во-первых, снижение интенсивности продукции АФК прооксидантными системами (оксидазы, дыхательная цепь) (Fandrey J. et al., 1994; Kroll S.L., Czyzyk-Krzeska M.F., 1998) и, во-вторых, активацию антиоксидантных систем. Последнее, действительно, имело место, так как, согласно нашим данным, активность каталазы увеличивалась на 20% в КГМ НУ и ВУ крыс (рис. 17 Е).

Гипоксическое снижение уровня гидроперекисей может рассматриваться как проадаптивный механизм, потенцирующий активацию (восстановление остатков цистеина в ДНК-связывающих доменах) некоторых редокс-чувствительных транскрипционных факторов (AP1, HIF-1, Sp1, p53) (Bloomfield K.L. et al., 2003; Galter D. et al., 1994; Haddad J.J., 2002; Meyer M. et al., 1993; Schenk H. et al., 1994; Ueno M. et al., 1999).

Таким образом, наиболее мягкий (субоптимальный) режим гипоксии, использованный однократно, индуцировал кратковременное снижение окисленности в КГМ НУ и ВУ крыс без существенного изменения других параметров системы глутатиона, сопряженное с усилением антиоксидантной защиты (активация каталазы). Все это свидетельствует о сохранении в этих условиях способности системы глутатиона в КГМ обоих типов крыс к ответной реакции, характерной для физиологической нормы, направленной на снижение свободнорадикальной активности и сохранение восстановительного фонда клетки, что говорит о сбалансированности ее работы и способности регулировать окислительно-восстановительный гомеостаз клеток. Однако восстановительная способность системы глутатиона в КГМ ВУ крыс в этих условиях была менее эффективна, чем у НУ.

Индукцированный однократным «слабым» гипоксическим воздействием кратковременный восстановительный сдвиг редокс-равновесия (снижение уровня GSSG) в КГМ НУ и ВУ крыс, уменьшался по мере увеличения количества экспозиций и сопровождался у ВУ крыс увеличением содержания гидроперекисных метаболитов на завершающем этапе курса (рис. 18 А,Б). После 20-го гипоксического воздействия уровень гидроперекисей в КГМ ВУ крыс был на 20% выше, чем в контроле (рис. 18 Б) и на 40% - сравнительно с НУ животными, что может свидетельствовать о более высокой активности прооксидантных систем в КГМ ВУ крыс в этих условиях. Активность каталазы увеличивалась в КГМ НУ и ВУ крыс после каждого гипоксического воздействия так же, как и после однократного применения (рис. 18 Е).

Таким образом, при курсовом применении наиболее «слабого» (субоптимального) режима гипоксии по мере увеличения числа предъявляемых воздействий, несмотря на активацию каталазы, развивались признаки активации ферментных систем, продуцирующих АФК, наиболее выраженные у ВУ крыс.



**Рис. 18.** Влияние многократного (курсового) применения ГБГ разной тяжести на активность антиоксидантных ферментов, содержание GSSG, гидроперекисей и продуктов ПОЛ в КГМ НУ и ВУ крыс (в % от контроля). К – контроль. 1, 3, 8, 12, 20 – количество ежедневных одночасовых воздействий разных режимов гипоксии. \* – статистически достоверные отличия от контроля ( $p < 0,05$ ).

Тем не менее, в целом можно говорить о сохранении в условиях периодической «слабой» гипоксии (ГБГ<sub>3000</sub>-14% O<sub>2</sub>; 1ч; 20 ежедневных воздействий) способности системы глутатиона в КГМ обоих типов крыс к ответной реакции, характерной для физиологической нормы, направленной на снижение свободнорадикальной активности и поддержание восстановительного фонда клетки, что говорит о

сбалансированности ее работы и способности регулировать окислительно-восстановительный гомеостаз клеток. Однако восстановительная способность системы глутатиона в КГМ ВУ крыс в этих условиях была менее эффективна, чем у НУ.

В отличие от применения «слабой» гипоксии, снижение уровня GSSG (восстановительный сдвиг редокс-равновесия) в КГМ обоих типов крыс наблюдалось только после первого воздействия гипоксии «средней тяжести» (10,5% O<sub>2</sub>, 1ч) и было менее выражено в сравнении с наиболее мягким (субоптимальным) режимом гипоксии. При последующих воздействиях снижение содержания GSSG и гидроперекисей в КГМ у НУ крыс постепенно нивелировалось вплоть до полного отсутствия реакции этих параметров на гипоксию в конце курса (рис. 18 А). У ВУ крыс, в отличие от НУ, уже с 3-го гипоксического воздействия уровень гидроперекисей достоверно увеличивался и продолжал нарастать с каждым очередным воздействием (рис. 18 Б). В этих условиях, уровень продуктов липидной пероксидации не менялся в КГМ НУ и ВУ крыс (рис. 18 Ж,З), что может указывать на отсутствие признаков развития окислительного стресса.

Таким образом, при курсовом применении гипоксии «средней тяжести» (10,5% O<sub>2</sub>) в КГМ НУ и ВУ крыс активировалась продукция АФК, что может быть связано с возрастающим в ходе периодической гипоксии влиянием стресс-активирующих гормонов (катехоламинов) (Bindoli A. et al., 1992; Li J. et al., 2010; Xu Q. et al., 2011) и факторов роста (Colavitti R. et al., 1998; Sundaresan M. et al., 1995).

При высоком уровне гидроперекисных соединений Cu,Zn-СОД имеет ключевое защитное значение, поскольку предотвращает восстановление H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> супероксидным анионом (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) и образование гидроксильного радикала (наиболее реакционной формы АФК), а также активацию процессов свободнорадикального и перекисного окисления. По нашим данным активность Cu,Zn-СОД была повышена при данном режиме гипоксии на протяжении всего гипоксического курса в КГМ как НУ, так и ВУ крыс (рис. 18 Д). Гипоксическая активация Cu,Zn-СОД была также показана в других исследованиях и рассматривается как один из механизмов нейропротекторного действия прекодиционирующих режимов гипоксии (Bordet R. et al., 2000; Obrenovitch T.P., 2008; Omata N. et al., 2006; Rojo A.I. et al., 2004; Sugawara T. et al., 2002).

Все это в целом свидетельствует о том, что индуцированное многократным применением гипоксии «средней тяжести» образование в КГМ ВУ крыс главного компонента пула гидроперекисей - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - осуществляется с большей интенсивностью по сравнению с НУ крысами, что при активации Cu,Zn-СОД и отсутствии признаков липидной пероксидации может иметь адаптивное значение, так как H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> участвует во внутриклеточном метаболизме, обладает вазодилататорными и ангиогенными эффектами, ограничивает развитие глутаматной эксайтотоксичности, выполняет функцию депо O<sub>2</sub> (Cai H., 2005; Chen B.T. et al., 2001; Geracitano R. et al., 2005; Iida Y., Katusic Z.S., 2000; Seutin V. et al., 1995).

Тем не менее, в ходе курсовой гипоксии «средней тяжести» в КГМ ВУ крыс проявлялись признаки дисбаланса про- и антиоксидантных систем. Повышенная продукция гидроперекисей сопровождалась у ВУ крыс снижением активности глутатионзависимых ферментов (рис. 18 В,Г), что может быть следствием ингибирующего влияния устойчиво повышенных концентраций пероксидов (Pigeolet E. et al., 1990).

Таким образом, при курсовом применении гипоксических воздействий «средней тяжести» (10,5% O<sub>2</sub>) антиоксидантная функция системы глутатиона в КГМ НУ животных сохранялась, также как и способность поддерживать значения параметров пула глутатиона на уровне, близком к норме. Однако потеря способности системы к увеличению восстановленности в ответ на гипоксическое воздействие свидетельствует о постепенном снижении в этих условиях регуляторной функции системы, направленной на поддержание восстановленности внутриклеточной среды. При этом в КГМ ВУ животных признаки дисрегуляции в системе глутатиона как при однократном, так и при курсовом применении гипоксии «средней тяжести» (10,5% O<sub>2</sub>) были существенно более выражены сравнительно с НУ.

При *однократном* воздействии «тяжелой» гипоксии (ГБГ<sub>7000</sub>, 8% O<sub>2</sub>, 1ч), в отличие от гипоксии «слабой» и «средней тяжести», в КГМ НУ и ВУ крыс наблюдалось не снижение, а достоверное увеличение содержания GSSG, гидроперекисей и ДК (рис. 17 А,Б,Ж), что указывает на развитие окислительного стресса. Этот процесс развивался в КГМ обоих типов крыс на фоне снижения активности каталазы (рис. 17 Е). Известно, что активация каталазы происходит при умеренном увеличении концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, однако при значительном увеличении уровня перекисей механизмы активации каталазы (фосфорилирование нерецепторными тирозинкиназами) нарушаются (Сао С. et al., 2003; Kharbanda S. et al., 1995; Sun X. et al., 2000). Характерной для гипоксии «средней тяжести» активации Cu,Zn-СОД не происходило (рис. 17 Д). У ВУ крыс в постгипоксическом периоде наблюдалось еще и снижение активности ГПО и ГР, что может быть связано с ингибирующим влиянием высоких концентраций гидроперекисей в КГМ этих животных (рис. 17 В,Г) (Pigeolet E. et al., 1990).

Развитие окислительного стресса в ткани мозга в условиях тяжелой гипоксии сопряжено с развитием глутаматной эксайтотоксичности. Приток Ca<sup>2+</sup> в нейроны через каналы NMDA рецепторов вызывает активацию оксидаз (Serrano F. et al., 2003; Tejada-Simon M.V. et al., 2005) и гиперпродукцию АФК. Было показано, что продолжительное увеличение содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и органических гидроперекисей вызывает ингибирование антиоксидантных ферментов (ГПО, Cu,Zn-СОД, каталазы), что усиливает дисбаланс про- и антиоксидантных систем (Bray R.C., Cockle S.A., 1974; Hodgson E.K., Fridovich I., 1975; Pigeolet E. et al., 1990).

Таким образом, уже при однократном воздействии тяжелой гипоксии происходит ослабление регуляторного влияния системы глутатиона, дисбаланс про- и

антиоксидантных систем, наиболее выраженный в КГМ ВУ крыс, развиваются признаки окислительного стресса.

При *курсовом* применении *тяжелой* гипоксии (ГБГ<sub>7000</sub>-8% O<sub>2</sub>, 1ч, 20 экспозиций) увеличение уровня GSSG, гидроперекисей, ДК и ТБК-ПП нарастало в процессе тренинга (рис. 18). В КГМ ВУ крыс, несмотря на сходный с НУ характер изменений GSSG и гидроперекисных метаболитов, их содержание было достоверно выше на всем протяжении курса. Одновременно в КГМ обоих фенотипов крыс на протяжении всего курса развивалось подавление активности каталазы (рис. 18 Е). В КГМ ВУ крыс наблюдали еще и снижение активности ГПО и ГР. Причем восстановления активности ферментов цикла глутатиона в конце курса, как это было при применении гипоксии «средней тяжести», не происходило (рис. 18 В,Г).

Таким образом, как однократное, так и курсовое применение тяжелой гипоксии приводило в КГМ крыс к выраженному окислительному стрессу, сопровождающемуся нарушением регуляторной функции глутатионового цикла, и дисбалансу про- и антиоксидантных систем, усиливающимся с увеличением числа предъявляемых воздействий. Все эти нарушения проявлялись в КГМ ВУ животных в значительно более выраженной форме, нежели у НУ.

Таким образом, очевидно, что функциональная активность системы глутатиона зависит как от тяжести и длительности гипоксического воздействия, так и от индивидуальной переносимости гипоксии, т.е. генетически детерминирована. В КГМ НУ крыс эта система сохраняет свои регуляторные свойства в более широком диапазоне сниженных значений рО<sub>2</sub> сравнительно с ВУ животными, а ее дизрегуляция наступает при более тяжелых формах гипоксии или при более длительном ее применении. Все это принципиально важно при выборе режимов гипоксического воздействия с целью терапевтического применения прекондиционирования. Оптимальными, по-видимому, следует считать такие гипоксические воздействия, которые не сопровождаются появлением признаков окислительного стресса.

**Роль редокс-статуса КГМ в индукции HIF-1 $\alpha$  и GPR91 при гипоксии и формировании адаптации.** Как следует из вышеизложенных данных, в ответ на воздействия «слабой» гипоксии и «средней тяжести» происходит увеличение восстановленности в КГМ обоих типов животных (снижение уровня GSSG и ГП) в раннем постгипоксическом периоде. Активация свободнорадикальных процессов при этом отсутствует. Тем не менее, в этих условиях наблюдается индукция срочной экспрессии HIF-1 $\alpha$  (НУ) и увеличение плотности GPR91 (НУ, ВУ) (рис. 19).

Наоборот, при «тяжелой» гипоксии, в условиях выраженного окислительного стресса наблюдалось снижение срочной экспрессии HIF-1 $\alpha$ , в то время как плотность GPR91 поддерживалась на контрольном уровне (рис. 19).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о независимости формирования *срочной* ответной реакции и HIF-1 $\alpha$ , и GPR91 на гипоксическое



воздействие слабой и средней тяжести от интенсивности свободнорадикальных процессов при гипоксии.

При многократном воздействии «слабой» гипоксии и «средней тяжести» признаки окислительного стресса также отсутствовали (КГМ НУ крыс), либо были слабо выражены (КГМ ВУ крыс).

При этом в КГМ НУ животных сохранялась способность максимально экспрессировать HIF-1 $\alpha$  и увеличивать плотность GPR91 в ответ на очередное гипоксическое воздействие, что совпадало с периодом формирования толерантности животных к гипоксии. Эта способность исчезала после 20-го сеанса, в период завершения формирования отсроченной адаптации (рис. 20).

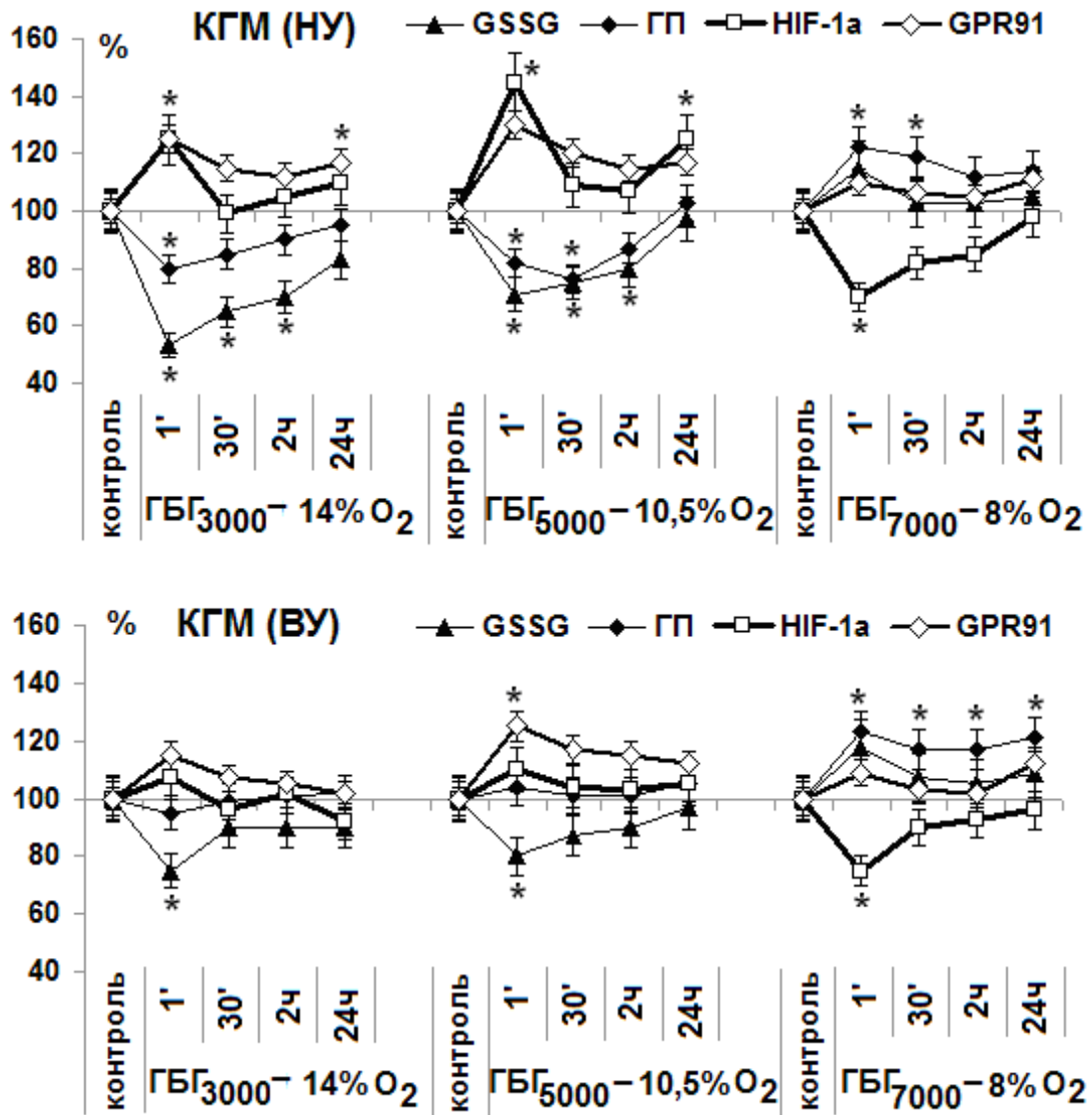


Рис. 19. Динамика экспрессии HIF-1 $\alpha$  и GPR91 при различных состояниях окислительно-восстановительных процессов в КГМ НУ и ВУ крыс, индуцированных однократным воздействием разных режимов ГБГ (в % от контроля). 1', 30', 2ч, 24ч – продолжительность постгипоксического периода. \* - данные статистически достоверно отличаются от контроля ( $p < 0,05$ ).

В КГМ ВУ крыс в этих условиях срочная экспрессия HIF-1 $\alpha$  не развивалась или была недостоверна. Увеличение плотности GPR91 происходило, фенотипические отличия отсутствовали (рис. 20).

Таким образом, и в этом случае полученные данные свидетельствуют о независимости динамики отсроченной экспрессии HIF-1 $\alpha$  и плотности GPR91 от интенсивности свободнорадикальных процессов при гипоксии.

В условиях курсового применения «тяжелой» гипоксии, с сопутствующим выраженным окислительным стрессом, наблюдалось подавление срочной и отсроченной экспрессии HIF-1 $\alpha$  и снижение способности к индукции GPR91. Таким образом, в этих условиях можно предполагать ограничительное влияние гиперактивации свободнорадикальных процессов на функцию и HIF-1 $\alpha$  и GPR91.

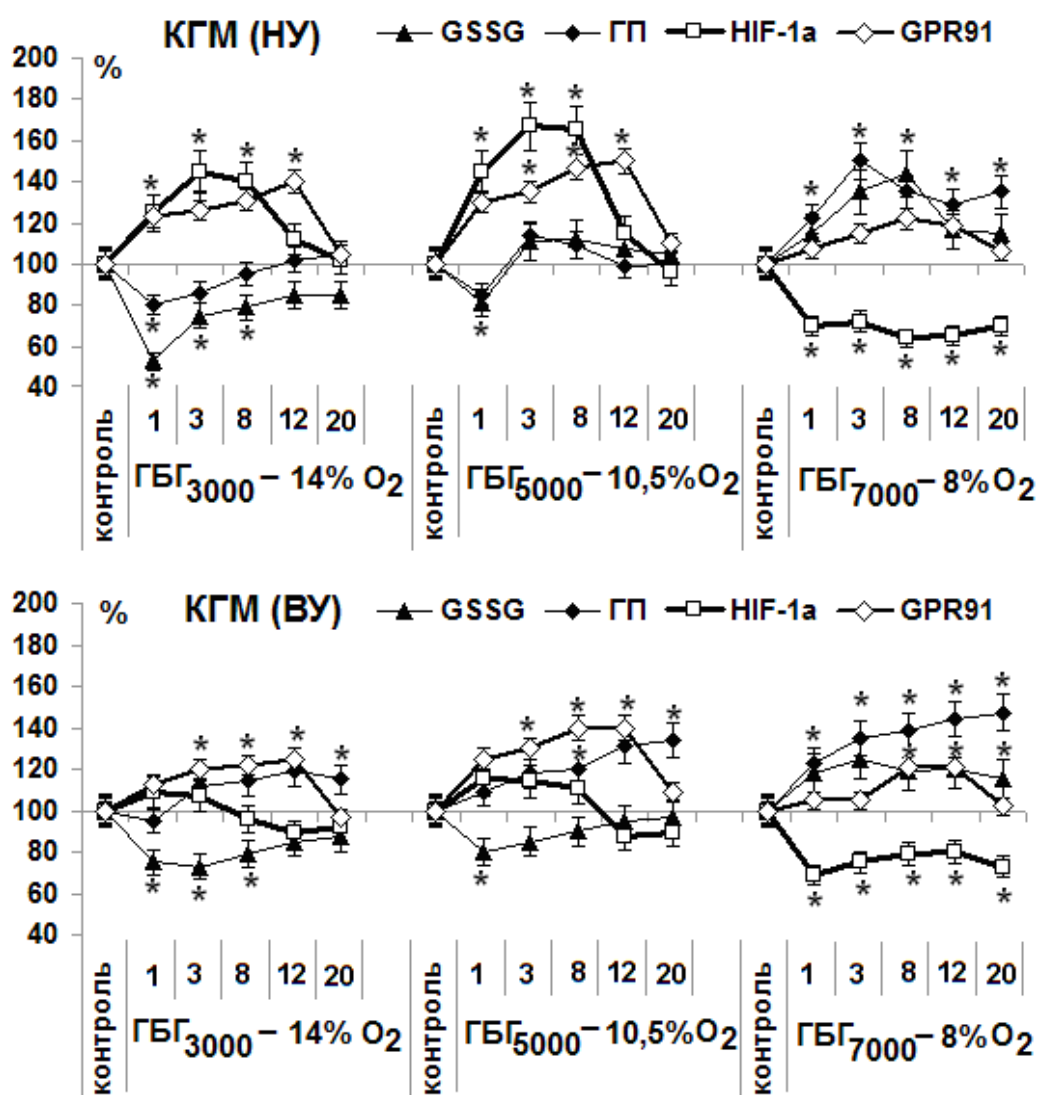


Рис. 20. Динамика экспрессии HIF-1 $\alpha$  и GPR91 при различных состояниях окислительно-восстановительных процессов в КГМ НУ и ВУ крыс, индуцированных многократным воздействием ГБГ разной тяжести (в % от контроля). 1, 3, 8, 12, 20 – количество ежедневных одночасовых воздействий разных режимов ГБГ. Ранний постгипоксический период (1 мин реоксигенации). \* - данные статистически достоверно отличаются от контроля ( $p < 0,05$ ).

Установленная нами в условиях повреждающей гипоксии и развития окислительного стресса устойчивая супрессия HIF-1 $\alpha$  отмечалась и в других исследованиях, согласно которым HIF-1 $\alpha$  в условиях увеличения свободнорадикальной активности подвергается окислению и убиквитин-независимой деградации в 20S-протеасоме (Shi H., 2009). Таким образом, протективное и проадаптивное влияние HIF-1 $\alpha$  может быть резко ограничено в условиях активации прооксидантных систем (длительные и тяжелые гипоксические и стресс-воздействия).

В отличие от HIF-1 $\alpha$  индукция GPR91 развивается в условиях «тяжелой гипоксии» и окислительного стресса, что позволяет рассматривать GPR91 как потенциальную нейропротекторную систему, реализующую защитно-адаптивные эффекты при патологических состояниях мозга, сопряженных с активацией свободнорадикальных процессов (ишемическое, токсическое, травматическое повреждение).

Проведенный анализ возможности влияния окислительно-восстановительных процессов в КГМ на сигнальную функцию HIF-1 $\alpha$  и GPR91 при гипоксии свидетельствуют в пользу независимости индукции *срочной* ответной реакции и того и другого от интенсивности свободнорадикальных процессов в условиях, наиболее благоприятных для формирования адаптивных процессов.

## ВЫВОДЫ

1. Доказано существование сукцинатзависимой сигнальной регуляции, участвующей в формировании срочных и отсроченных молекулярных механизмов адаптации и увеличении резистентности организма к дефициту кислорода. При этом сукцинат выступает в роли сигнальной молекулы, реализующей свои эффекты при гипоксии по типу аутокринного сигнала через активацию транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  и рецептора GPR91.

2. Индуцируемая гипоксией сукцинатзависимая срочная экспрессия транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  тканеспецифична, фенотипична, дозозависима. Гипоксическая активация этой системы в КГМ - мишени для HIF-1 $\alpha$  - характерна для НУ к острой гипоксии крыс, имеет короткий латентный период (30 мин), развивается в широком диапазоне сниженных концентраций кислорода во вдыхаемом воздухе, подавляется при тяжелых формах гипоксии, сопровождается формированием срочной и отсроченной защитно-адаптивной резистентности этих животных к дефициту кислорода, зависит от активности как сукцинатоксидазного окисления (МФК II), так и ГАМК-шунта и индуцируется сукцинатсодержащими препаратами, т.е. регулируется сукцинатом эндогенного и экзогенного происхождения.

3. При гипоксии в условиях *in vivo* в нейронах КГМ реализуется сложная, многокомпонентная система срочного регулирования стабильности HIF-1 $\alpha$ , обеспечивающая оптимальные условия для экспрессии HIF-1 $\alpha$  и HIF-1 $\alpha$ -зависимых адаптивных генов. Наряду с сукцинатзависимым ингибированием

пролилгидроксилазных реакций, инициирующих убиквитин-зависимый протеолиз HIF-1 $\alpha$ , она включает экспрессию белка теплового шока HSP90, защитное действие которого более выражено в КГМ НУ крыс. Белок теплового шока HSP70 не участвует в этом процессе.

4. Срочная сукцинатзависимая гипоксическая индукция GPR91 – тканеспецифичный процесс, наиболее выраженный в КГМ (ткань-мишень) НУ животных, имеет короткий латентный период (менее 15 мин) и достигает максимальных значений через 45-60 мин, что совпадает во времени с периодом формирования срочной резистентности организма к гипоксии. В КГМ гипоксическая индукция GPR91 проявляется в более широком диапазоне сниженных концентраций кислорода (14-8% O<sub>2</sub>) в отличие от других тканей (миокард, печень), зависит от активности ГАМК-шунта, являющегося в этих условиях источником эндогенного сукцината для рецептора, вовлечена в механизм формирования срочных и отсроченных механизмов адаптации и более выражена у НУ животных. Курсовое применение гипоксии индуцирует дополнительное увеличение плотности GPR91, которое при любых использованных режимах гипоксии наиболее выражено в КГМ и коррелирует с формированием отсроченной адаптации организма к гипоксии.

5. Исследованные два фенотипа крыс характеризуются различной активностью HIF-1 $\alpha$ - и GPR91-зависимых процессов в КГМ и их вовлеченностью в формирование адаптивных реакций, что свидетельствует о существовании двух различных механизмов формирования толерантности к гипоксии. Для КГМ НУ крыс сравнительно с ВУ характерны:

- более низкий базовый уровень сукцината, СДГ и плотности GPR91 и более высокий – HIF-1 $\alpha$ ;
- более выраженное увеличение при гипоксии содержания сукцината, активности СДГ, коррелирующее с более интенсивной срочной гипоксической экспрессией HIF-1 $\alpha$  и увеличением плотности GPR91;
- более выраженная зависимость гипоксической экспрессии HIF-1 $\alpha$  и GPR91 от активности ГАМК-шунта;
- более выраженная зависимость гипоксической индукции GPR91 и отрицательной регуляции экспрессии HIF-1 $\alpha$  от активации  $\beta$ -адренорецепторов.

6. Гипоксическая индукция VEGF наблюдается в тканях НУ и ВУ крыс в ограниченном диапазоне сниженных концентраций O<sub>2</sub> во вдыхаемом воздухе (10,5% O<sub>2</sub>), наиболее выражена в КГМ и сопряжена с активацией гипоксической экспрессии HIF-1 $\alpha$  (НУ животные), либо осуществляется HIF-1 $\alpha$ -независимо (ВУ), но при этом положительно коррелирует с гипоксической экспрессией GPR91 в КГМ обоих фенотипов крыс.

7. Экзогенный сукцинат (мексидол), введенный животным *in vivo*, способствует: 1) активации экспрессии HIF-1 $\alpha$  в КГМ в гипоксических условиях и не влияет на этот процесс в нормоксических условиях; 2) увеличению плотности GPR91

в КГМ крыс как в нормоксических, так и гипоксических условиях. Для достижения максимально высокой плотности GPR91 в нормоксических условиях необходимо от 3-х до 8 ежедневных инъекций мексидола.

8. Функциональная активность системы глутатиона зависит как от тяжести и длительности гипоксического воздействия, так и от индивидуальной переносимости гипоксии, т.е. генетически детерминирована. В КГМ НУ крыс эта система сохраняет свои регуляторные свойства в более широком диапазоне сниженных значений  $pO_2$  сравнительно с ВУ животными, а ее дизрегуляция наступает при более тяжелых формах гипоксии или при более длительном ее применении. Усиление свободнорадикальной активности и нарушение регуляторной функции системы глутатиона, контролирующей антиоксидантную защиту КГМ, выявляются при тяжелых гипоксических воздействиях и, следовательно, не являются индукторами экспрессии HIF-1 $\alpha$  и GPR91 при более мягких режимах гипоксических воздействий, в условиях максимальной их индукции и аккумуляции.

9. При выборе режимов гипоксических воздействий, индуцирующих адаптивные процессы, необходимо учитывать индивидуальную врожденную толерантность организма к гипоксии. При низкой базовой устойчивости организма к дефициту кислорода для активации HIF-1 $\alpha$ -зависимых механизмов адаптации могут применяться короткие курсы (3-8 дней) непродолжительных (не более 60 минут) неповреждающих (14-12%  $O_2$ ) гипоксических воздействий. Проведение гипокситерапии может осуществляться при обязательном мониторинговании про-, дезадаптивных состояний (активация процессов свободнорадикального окисления), индуцируемых гипоксией. При высокой врожденной устойчивости к гипоксии индукция HIF-1 $\alpha$ -зависимых механизмов адаптации, нейро- и кардиопротекторных эффектов гипокситерапии, потенцируется неспецифическими блокаторами  $\beta$ -адренорецепторов.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и других рецензируемых научных изданиях

1. **Кирова Ю.И.**, Бородулин В.Б. Аэробный статус клетки, устойчивость к гипоксии и пролиферация // Успехи геронтологии. - 2009. – Т. 22, № 1. - С. 74-83.

2. Лукьянова Л.Д., Козлов Л.В., Бичучер А.М., **Кирова Ю.И.**, Германова Э.Л. Срочная реакция системы комплемента неустойчивых к гипоксии крыс на гипоксические воздействия // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 2010. - Т. 150, № 12. - С. 626-633.

3. Лукьянова Л.Д., **Кирова Ю.И.** Влияние гипоксического прекоондиционирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 2011. – Т. 151, № 3. – С. 263-267.

4. Lukyanova L.D., Germanova E.L., **Kirova Yu.I.** The signal function of succinate and free radicals in mechanisms of preconditioning and long-term adaptation to hypoxia // *Adaptation Biology and Medicine. Cell Adaptations and Challenges* / Eds P. Wang, C.H. Kuo, N. Takeda, P.K. Singal. - New Delhi: Narosa Publ. House, 2011. – V. 6. – P. 251–277.

5. Лукьянова Л.Д., **Кирова Ю.И.**, Сукоян Г.В. Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции // *Патогенез*. - 2011. – Т. 9, № 3. – С. 4-14.

6. Лукьянова Л.Д., **Кирова Ю.И.**, Сукоян Г.В. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции // *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация* / Под ред. В.П. Зинченко, С.С. Колесникова, А.В. Бережнова. – Пушино: ИД В. ЕМА, 2011. – Т. 1. – С. 16-23.

7. Сукоян Г.В., **Кирова Ю.И.**, Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. О роли цитокинов и некоторых показателей липидного обмена в формировании срочной адаптации к интервальной гипоксии и аккумуляции HIF-1 $\alpha$  // *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация* / Под ред. В.П. Зинченко, С.С. Колесникова, А.В. Бережнова. – Пушино: ИД В. ЕМА, 2011. – Т. 1. – С. 40-46.

8. Лукьянова Л.Д., **Кирова Ю.И.**, Сукоян Г.В. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции // *Биологические мембраны*. - 2012. – Т. 29, № 4. - С. 238-252.

9. **Кирова Ю.И.** Влияние гипоксии на динамику содержания HIF-1 $\alpha$  в коре головного мозга и формирование адаптации у крыс с различной резистентностью к гипоксии // *Патол. физиол. и эксп. терапия*. - 2012. - №3. – С. 51-55.

10. Lukyanova L.D., **Kirova Yu.I.**, Germanova E.L. Energetropic effects of intermittent hypoxia: role of succinate-dependent signaling // *Intermittent Hypoxia and Human Diseases* / Eds Lei Xi, T.V. Serebrovskaya. – London: Springer-Verlag, 2012. – P. 239-252.

11. Лукьянова Л.Д., Сукоян Г.В., **Кирова Ю.И.** О роли провоспалительных факторов, оксида азота и некоторых показателей липидного обмена в формировании срочной адаптации к гипоксии и аккумуляции HIF-1 $\alpha$  // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* - 2012. – Т. 154, № 11. - С. 550-555.

12. **Кирова Ю.И.**, Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности динамики содержания HIF-1 $\alpha$  в неокортексе крыс при различных режимах гипоксии // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* - 2012. – Т. 154, № 12. - С. 681-686.

13. **Кирова Ю.И.**, Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности экспрессии фактора, индуцированного гипоксией, и редокс-статус клеток неокортекса крыс на разных стадиях адаптации к гипоксии // *Фізіологічний журнал*. - 2013. – Т. 59, № 6. – С. 99-111.

14. **Кирова Ю.И.**, Шакова Ф.М., Германова Э.Л., Пальцын А.А., Романова Г.А., Рыбникова Е.А., Лукьянова Л.Д. Ранние изменения экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) в неокортексе крыс с разной толерантностью к

острой гипоксии, перенесших фокальный ишемический инсульт префронтальной коры // Патол. физиол. и эксп. терапия. - 2014. - № 3. – С. 9-16.

15. **Кирова Ю.И.** Роль системы глутатиона в регуляции окислительно-восстановительного статуса коры головного мозга крыс при гипоксии // Патол. физиол. и эксп. терапия. - 2014. - № 4. – С. 40-47.

16. **Kirova Yu.I.**, Germanova E.L., Lukyanova L.D. The role of oxidative stress in the induction of transcription factors at different stages of adaptation to hypoxia // *Adaptation Biology and Medicine. New Challenges* / Eds L.M. Popescu, A.R. Hargens, P.K. Singal. - New Delhi, India: Narosa Publishing House, 2014. – V. 7. – P. 261-277.

17. Lukyanova L.D., **Kirova Yu.I.**, Sukoyan G.V., Germanova E.L. Role of HIF-1 $\alpha$  in signaling mechanisms of urgent and long-term adaptation in different regimens of hypoxic training // *Adaptation Biology and Medicine. New Challenges* / Eds L.M. Popescu, A.R. Hargens, P.K. Singal. - New Delhi, India: Narosa Publishing House, 2014. – V. 7. – P. 279-305.

18. Lukyanova L.D., **Kirova Yu.I.** Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia // *Frontiers in Neuroscience*. - 2015. - V. 9. – P. 1-15.

19. Лукьянова Л.Д., **Кирова Ю.И.**, Германова Э.Л. Особенности срочной экспрессии сукцинатзависимого рецептора GPR91 в тканях при гипоксии // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2015. – Т. 160, № 12. – С. 703-708.

20. **Кирова Ю.И.**, Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Сукцинатзависимый рецептор GPR91: особенности его экспрессии в тканях при гипоксии // *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация* / Под ред. В.П.Зинченко, А.В. Бережнова. – Пушкино: Fix-Print, 2015. – Т. 2. - С. 497-484.

#### **Тезисы докладов на конференциях**

21. Lukyanova L.D, **Kirova Yu.I.**, Germanova E.L., Lysko A.I. The signal function of succinate and free radicals in mechanisms of preconditioning and long-term adaptation to hypoxia // *IX World Congress of International Society of Adaptive Medicine*. - Taipei, Taiwa, Aug 2-5, 2009. - P. 45-48.

22. **Кирова Ю.И.**, Лукьянова Л.Д., Копаладзе Р.А. Влияние гипоксического прекоондиционирования на свободнорадикальные процессы и систему антиоксидантной защиты в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии // *Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды: Материалы Всероссийской конференции с международным участием*. - Санкт-Петербург-Колтуши, 7-9 октября 2010. - С. 134-135.

23. **Кирова Ю.И.**, Германова Э.Л., Лыско А.И., Копаладзе Р.А., Лукьянова Л.Д. Новое о роли свободнорадикальных процессов в формировании срочных механизмов адаптации к гипоксии // *XXI Съезд Физиологического общества имени И.П.Павлова*. – Калуга, 19-25 сентября 2010. - С. 271.

24. **Кирова Ю.И.**, Лукьянова Л.Д. Роль HIF-1 $\alpha$  в формировании адаптации к гипоксии // *Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция: Материалы VI Российской конференции с международным участием*. – Москва, 11-13 октября 2011. - С. 37.

25. **Кирова Ю.И.**, Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. О сигнальной роли свободнорадикальных процессов в формировании срочной и долгосрочной адаптации к гипоксии // Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция: Материалы VI Российской конференции с международным участием. – Москва, 11-13 октября 2011. - С. 38.

26. Козлов Л.В., **Кирова Ю.И.**, Бичучер А.М., Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности реакции системы комплемента на гипоксические воздействия // Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция: Материалы VI Российской конференции с международным участием. – Москва, 11-13 октября 2011. - С. 38.

27. **Кирова Ю.И.**, Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности экспрессии HIF-1 $\alpha$  на разных стадиях адаптации к гипоксии // Высокогорная гипоксия и геном: Материалы II Международной научной конференции. – Терскол, 14-17 августа 2012. - Фізіологічний журнал. – 2012. - Т. 58, № 4. - С. 64.

28. **Kirova Yu.** The role of oxidative stress in the induction of transcription factors at different stages of adaptation to hypoxia // The 10<sup>th</sup> World Congress of the International Society for Adaptive Medicine. – Bucharest, Romania, June 7-10, 2012. - P. 91.

29. Лукьянова Л.Д., **Кирова Ю.И.**, Сукоян Г.В., Германова Э.Л. Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роли в системной регуляции // Эколого-физиологические проблемы адаптации: Материалы XV Всероссийского симпозиума. – Москва, 6-9 июня 2012. - С. 136-138.

30. **Кирова Ю.И.**, Германова Э.Л., Козлов Л.В., Лукьянова Л.Д. Реакция системы комплемента крови на гипоксические воздействия и ее связь с сигнальными механизмами адаптации к гипоксии в неокортексе // Взаимодействие нервной и иммунной системы в норме и патологии: Материалы IV Международного Симпозиума. - Санкт-Петербург, 18-21 июня 2013. - С. 109-110.

31. Лукьянова Л.Д., **Кирова Ю.И.** Сигнальная роль митохондрий при гипоксии и адаптации // IV Съезд Физиологов СНГ. - Сочи-Дагомыс, 8-12 октября 2014. - С. 22.

32. Лукьянова Л.Д., **Кирова Ю.И.**, Германова Э.Л. Фенотипические особенности работы двух митохондрио-зависимых сигнальных систем в КГМ в условиях гипоксии: сукцинатзависимого рецептора GPR-91 и гипоксического транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$  // Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга: Материалы Всероссийской конференции с международным участием. - Санкт-Петербург-Колтуши, 24-26 июня 2014. - С. 89.

33. Lukyanova L.D., **Kirova Y.I.** Role of the mitochondria-dependent receptor GPR-91 in signal mechanisms of adaptation to hypoxia // The 11<sup>th</sup> world Congress of the International Society for adaptive medicine. - Yonago, Japan, May 27-30, 2015. - P. 30.

34. Kirova Yu.I., Lukyanova L.D. Regulatory role of glutathione system and related redox processes in the adaptation of the brain to hypoxia // The 11<sup>th</sup> World Congress of the International Society for adaptive medicine. - Yonago, Japan, May 27-30, 2015. - P. 37.



**СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

- АФК – активные формы кислорода  
ВЖ – время жизни животных на критической высоте  
ВУ – высокоустойчивые к гипоксии крысы  
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота  
ГБГ – гипобарическая гипоксия  
ГП – гидроперекисные метаболиты  
ГПО – глутатионпероксидаза  
ГР – глутатионредуктаза  
ДК – диеновые конъюгаты полиненасыщенных жирных кислот  
КГМ – кора головного мозга  
МФК – митохондриальный ферментный комплекс  
НАД – никотинамидадениндинуклеотид  
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат  
НУ – низкоустойчивые к гипоксии крысы  
ОГБГ – острая гипобарическая гипоксия  
ОДЕ – относительные денситометрические единицы  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
СДГ – сукцинатдегидрогеназа  
Cu,Zn-SOD – Cu,Zn-супероксиддисмутаза  
ТБК-РП – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой  
ТСК – тиосемикарбазид  
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот  
ECL reagents - enhanced chemiluminescence reagents;  
реагенты, усиливающие хемилюминесценцию  
GPR91 – G-protein-coupled receptor 91; G-белок-сопряженный рецептор 91;  
сукцинатный рецептор  
G – общий глутатион  
GSH – восстановленный глутатион  
GSSG – окисленный глутатион  
HIF – hypoxia-inducible factor; фактор транскрипции, индуцируемый гипоксией  
HSP70 – the 70-kilodalton heat shock proteins;  
белки теплового шока с молекулярной массой 70 кДа  
HSP90 – the 90-kilodalton heat shock proteins;  
белки теплового шока с молекулярной массой 90 кДа  
VEGF – vascular endothelial growth factor; фактор роста эндотелия сосудов