

Особенности экспрессии HIF-1 α и HIF-3 α в гипоталамусе у крыс линии Вистар под влиянием прерывистой гипобарической гипоксии

А. В. Абрамов, В. А. Шаменко

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

Ключевые слова:

прерывистая гипоксия, гипоталамус, фактор, индуцибельный гипоксией.

Патология. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 156–162

DOI:

10.14739/2310-1237.2017.2.109291

E-mail:

abramov@zsmu.pp.ua

Цель работы – установить особенности экспрессии генов *hif-1 α* и *hif-3 α* , накопления белков HIF-1 α и HIF-3 α в нейронах паравентрикулярного (ПВЯ) и супраоптического (СОЯ) ядер гипоталамуса в условиях действия прерывистой гипоксии и в постгипоксический период.

Материалы и методы. Прерывистую гипоксию моделировали ежедневным 6-часовым пребыванием крыс на высоте 6000 м ($pO_2 = 9,8\%$) в течение 15 дней, постгипоксический период составлял 10 дней. Распределение белков HIF-1 α и HIF-3 α в гипоталамусе изучали с помощью иммунофлуоресцентного метода. Уровни экспрессии мРНК генов *hif-1 α* и *hif-3 α* в гипоталамусе определяли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени.

Результаты. Установлено, что прерывистая гипоксия приводила к нарастанию в медиобазальном гипоталамусе уровня мРНК к HIF-1 α в 13 раз, а к HIF-3 α – в 8,6 раза. При этом в нейронах медиального мелкоклеточного (ммПВЯ) и задне-латерального крупноклеточного (злкПВЯ) субъядер ПВЯ наблюдалось увеличение площади иммунореактивности к HIF-1 α и HIF-3 α , а также нарастание содержания белка HIF-1 α в 2,5 (ммПВЯ) и 3,4 (злкПВЯ) раза, а белка HIF-3 α – в 1,7 и 3,0 раза соответственно. В постгипоксический период уровни мРНК к HIF-1 α и HIF-3 α в гипоталамусе снижались, но концентрация мРНК к HIF-1 α оставалась в 2,5 раза выше, чем в контроле. При этом содержание белков HIF-1 α и HIF-3 α сохранялось повышенным в мелкоклеточных нейронах ПВЯ и снижалось на 50–60 % в крупноклеточных нейронах ПВЯ. Реакция нейронов СОЯ на гипоксию характеризовалась снижением экспрессии белков HIF-1 α и HIF-3 α , что проявлялось снижением площади иммунореактивности в нейронах с частичным восстановлением в постгипоксический период.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что прерывистая гипоксия приводит к усилению экспрессии генов семейства *hif*, повышению синтеза белков HIF в нейронах ПВЯ и сохранению данного эффекта в постгипоксический период.

Ключові слова:

переривчаста гіпоксія, гіпоталамус, фактор, що індукується гіпоксією.

Патологія. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 156–162

Особливості експресії HIF-1 α та HIF-3 α в гіпоталамусі щурів лінії Вистар за умов переривчастої гіпобаричної гіпоксії

А. В. Абрамов, В. О. Шаменко

Мета роботи – встановити особливості експресії генів *hif-1 α* та *hif-3 α* , накопичення білків HIF-1 α та HIF-3 α в нейронах паравентрикулярного (ПВЯ) та супраоптичного (СОЯ) ядер гіпоталамуса в умовах дії переривчастої гіпоксії та в постгіпоксичний період.

Матеріали та методи. Переривчасту гіпоксію моделювали щоденним 6-годинним перебуванням щурів на висоті 6000 м ($pO_2 = 9,8\%$) протягом 15 днів, постгіпоксичний період становив 10 днів. Розподіл білків HIF-1 α та HIF-3 α в гіпоталамусі досліджували імунофлуоресцентним методом. Рівень експресії мРНК генів *hif-1 α* та *hif-3 α* в гіпоталамусі визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в реальному часі.

Результати. Встановили, що переривчаста гіпоксія призводила до зростання в медиобазальному гіпоталамусі рівня мРНК до HIF-1 α у 13 разів, а до HIF-3 α – у 8,6 раза. При цьому в нейронах медіального дрібноклітинного (ммПВЯ) та задньолатерального крупноклітинного (злкПВЯ) суб'ядер ПВЯ спостерігалось збільшення площі імунореактивності до HIF-1 α та HIF-3 α , а також зростання вмісту білка HIF-1 α у 2,5 (ммПВЯ) та 3,4 (злкПВЯ) раза, а білка HIF-3 α – в 1,7 і 3,0 раза відповідно. У постгіпоксичний період рівень мРНК до HIF-1 α та HIF-3 α в гіпоталамусі знижувався, але концентрація мРНК до HIF-1 α залишалась у 2,5 раза вищою, ніж у контролі. При цьому вміст білків HIF-1 α та HIF-3 α зберігався підвищеним у дрібноклітинних нейронах ПВЯ та знижувався на 50–60 % у крупноклітинних нейронах ПВЯ. Реакція нейронів СОЯ на гіпоксію характеризувалась зниженням експресії білків HIF-1 α та HIF-3 α , що проявлялось зниженням площі імунореактивності в нейронах із частковим відновленням у постгіпоксичний період. Результати свідчать, що переривчаста гіпоксія призводить до посилення експресії генів сімейства *hif*, підвищення синтезу білків HIF у нейронах ПВЯ та збереження цього ефекту в постгіпоксичний період.

Key words:

hypoxia, hypothalamus, hypoxia-inducible factor.

Pathologia

2017; 14 (2), 156–162

Peculiarities of expression of HIF-1A and HIF-3A in hypothalamus of Wistar rats under the influence of intermittent hypobaric hypoxia

A.V. Abramov, V.A. Shamenko

The purpose of this study was to establish the features of the expression of *hif-1 α* and *hif-3 α* genes and the accumulation of HIF-1 α and HIF-3 α proteins in the paraventricular (PVH) and supraoptic (SO) nuclei of the hypothalamus under the conditions of intermittent hypoxia and in post-hypoxic periods.

Materials and methods. Intermittent hypoxia was modeled by a daily 6 hour stay of rats at an altitude of 6000 m ($pO_2 = 9,8 \%$) for 15 days, the posthypoxic period was 10 days. The distribution of HIF-1 α and HIF-3 α proteins in the hypothalamus was investigated by immunofluorescence methods. A molecular-genetic study was carried out using polymerase chain reaction with real-time reverse transcription of mRNA expression level of the *hif-1 α* and the *hif-3 α* gene.

Results. It was established that intermittent hypoxia led to a 13-fold increase in the mRNA level in the mediobasal hypothalamus to HIF-1 α , and 8,6-fold to HIF-3 α . In neurons of medial parvocellular (PVHmp) and posterior lateral magnocellular subnuclei (PVHpm) of PVH, an increase in the area of immunoreactivity to HIF-1 α and to HIF-3 α was observed, as well as an increase in the HIF-1 α protein content of 2,5 (PVHmp) and 3,4 (PVHpm) times, and the HIF-3 α protein in 1,7 and 3,0 times, respectively. In the posthypoxic period, the level of mRNA to HIF-1 α and HIF-3 α in the hypothalamus decreased, but for HIF-1 α remained 2.5 times higher than in the control. At the same time, the content of HIF-1 α and HIF-3 α proteins remained increased in parvocellular neurons of PVH and decreased by 50-60% in magnocellular neurons of PVH. The reaction of neurons of SO to hypoxia was characterized by a decrease in the expression of HIF-1 α and HIF-3 α proteins, which was manifested by a decrease in the area of immunoreactivity in neurons partially restored in the post-hypoxic period.

Conclusion. The results show that intermittent hypoxia leads to an increase in the expression of the *hif* gene family and to an increase in the synthesis of HIF proteins in PVH neurons and its preservation in the post-hypoxic period.

Факторы, индуцибельные гипоксией (HIF), представлены тремя изоформами белков – HIF-1, HIF-2 и HIF-3, экспрессия которых в клетках увеличивается при действии гипоксии. У человека и животных белки семейства HIF играют роль транскрипционных факторов и регулируют экспрессию более 600 генов, кодирующих синтез ключевых белков, вовлечённых в физиологический ответ на гипоксию [1–5]. Баланс между различными формами белка HIF определяет уровень физиологических реакций органов и тканей на гипоксию, интенсивность эритропоэза, ангиогенеза, вазомоторных реакций, функциональной активности эндокринных желёз и метаболических процессов [2,6–9].

Одно из важных звеньев адаптации организма к гипоксии связано с участием нейросекреторных ядер гипоталамуса в механизмах нейроэндокринного ответа на недостаток кислорода. В частности, нейроны медиального мелкоклеточного субъядра ПВЯ (ммПВЯ) синтезируют кортикотропин-рилизинг гормон (CRH) и определяют реактивность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГТАКС) в ответ на действие стрессора любой природы [10–12], обеспечивают развитие адапционных реакций и формирование резистентности организма к стрессовому фактору [13,14].

Адаптивным действием обладает и другой гормон гипоталамуса – вазопрессин (AVP), который синтезируется в нейронах заднего латерального крупноклеточного субъядра ПВЯ (злкПВЯ), супраоптического ядра (СОЯ), а также как ко-трансмиссер в нейронах ммПВЯ [6,10,12,15]. Ранее нами было показано повышение функциональной активности нейронов ПВЯ при адаптации к гипоксической гипоксии [16–18]. Однако особенности экспрессии белков семейства HIF в гипоталамических ядрах при действии прерывистой гипоксии до настоящего времени не изучены.

Цель работы

Установить особенности экспрессии генов *hif-1 α* и *hif-3 α* , накопления белков HIF-1 α и HIF-3 α в нейронах паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса в условиях действия прерывистой гипоксии и в постгипоксический период.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 48 половозрелых самцов крыс линии Вистар массой 220–250 г, которые были разделены на 3 группы по 16 животных в каждой: контрольная, с 15-дневными гипоксическими тренировками (ГТ), с ГТ и 10-дневным постгипоксическим периодом. Прерывистую гипоксию (ГТ) моделировали ежедневным 6-часовым пребыванием крыс в вентилируемой барокамере (объём – 1,0 м³) с постепенным повышением высоты с 1000 м до 6000 м с 1 по 6 день эксперимента (по 1000 м в день) и последующим пребыванием на высоте 6000 м ($pO_2 = 9,8 \%$) до 15 дня исследований.

Мозг экспериментальных животных быстро извлекали после одномоментной декапитации под тиопенталовым наркозом (50 мг/кг) через 24 часа после окончания эксперимента. Для определения белков HIF и экспрессии генов *hif* мозг фиксировали в жидкости Буэна (20 часов) и после стандартной гистологической обработки заливали в парапласт (MkCormick, США). Объектом изучения были медиальное мелкоклеточное (ммПВЯ) и заднелатеральное крупноклеточное (злкПВЯ) субъядра паравентрикулярного ядра гипоталамуса, а также супраоптическое ядро гипоталамуса (СОЯ) [10,15].

Для иммунофлюоресцентного выявления белков HIF серийные фронтальные срезы гипоталамуса толщиной 14 мкм депарафинировали и демаскировали в цитратном РТ-буфере (pH = 6,0) в РТ-модуле (Thermo Scientific, США), инкубировали (24 часа, T = +4 °C) с мышиными моноклональными антителами (IgG) к HIF-1 α или HIF-3 α (Santa Cruz Biotechnology, США) (разведение 1:200), затем – с козыми антителами к IgG мыши, конъюгированными с FITC (Santa Cruz Biotechnology, США) (разведение 1:64, 45 мин, T = +36 °C) и заключали в смесь глицерин/фосфатный буфер (9:1). Изучение иммунофлюоресцентной реакции проводили на микроскопе Axiomager-M2 (Carl Zeiss, ФРГ), оснащённом камерой AxioCam-HRm (Carl Zeiss, ФРГ), с применением высокоэмиссионного светофильтра 38HE (lex = 470/40 нм, lem = 525/50 нм) (Carl Zeiss, ФРГ). Количественный анализ иммунофлюоресцентной реакции проводили с помощью системы цифрового анализа изображения AxioVision-4.8.2 (Carl Zeiss, ФРГ): определяли площадь иммунореактивного материала

(мкм²) и содержание белков HIF (усл. ед. иммунофлюоресценции – Еиф) в области субъядер ПВЯ и СОЯ.

Для оценки относительного уровня мРНК к HIF-1 α и HIF-3 α в медиобазальном гипоталамусе использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР). Ткань гипоталамуса депарафинировали, гомогенизировали и с помощью набора «Trizol RNA Prep 100» (Изоген, Российская Федерация) выделяли РНК, концентрацию и качество которой оценивали на спектрофотометре Libra S32PC (Biochrom Ltd., Великобритания). Обратную транскрипцию (синтез кДНК) проводили с использованием набора реагентов «ОТ» (Синтол, Российская Федерация). Специфические пары праймеров для анализа исследуемого и референсного генов были подобраны с помощью программного обеспечения Primer-BLAST (NIH, США) и синтезированы фирмой Invitrogen (Thermo Scientific, США): для HIF-1 α использовали прямой праймер GGC GAG AAC GAG AAG AAA AAT AGG, обратный праймер TCG ACG TTC GGA ACT CAT CC; для HIF-3 α использовали прямой праймер CAC GCT TTG GAC TCT GAT GC и обратный праймер GCT CAG CAA AGT GTG GAT GC; в качестве референс-гена был использован ген глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH). Определение уровня экспрессии исследуемых генов *hif* проводили с использованием набора Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, США) на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США). Для выражения относительного уровня экспрессии генов использовали сравнительный $\Delta\Delta C_t$ метод. Анализ данных ПЦР проводили с помощью программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad, США).

Статистический анализ экспериментальных данных проводили пакетом программ для статистического анализа EXCEL 2003 (Microsoft Corp.) с интегрированной программой надстройкой AtteStat [19]. Для оценки достоверности различий в группах применяли *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Гипоксические тренировки (ГТ) приводили к повышению иммунореактивности к HIF-1 α в области ПВЯ более чем на 50 %: в ммПВЯ площадь иммунореактивности увеличивалась на 58,7 % ($p < 0,001$), а в злкПВЯ – на 55,1 % ($p < 0,005$) (табл. 1). Это сопровождалось нарастанием содержания белка HIF-1 α в структурах: в ммПВЯ – в 2,5 раза ($p < 0,001$), а в злкПВЯ – в 3,4 раза ($p < 0,001$). На этом фоне в медиобазальном гипоталамусе отмечалось 13-кратное нарастание уровня мРНК к HIF-1 α , что свидетельствовало об активации гена *hif-1 α* под влиянием ГТ. Вместе с тем в области крупноклеточных нейронов СОЯ ГТ приводили к ограничению площади иммунореактивности к HIF-1 α в нейронах на 46 % ($p < 0,001$) без изменения содержания белка ($p > 0,5$).

В отличие от HIF-1 α , увеличение экспрессии белка HIF-3 α в ответ на ГТ в большей степени проявлялось в крупноклеточном злкПВЯ, в котором площадь иммунореактивности к HIF-3 α увеличивалась в 2 раза ($p < 0,001$), а содержание самого белка – в 3

раза ($p < 0,001$) (табл. 2). В мелкоклеточном ммПВЯ площадь иммунореактивности к белку HIF-3 α не изменялась ($p > 0,1$), а его содержание увеличивалось на 73,5 % ($p < 0,001$). В области крупноклеточных нейронов СОЯ гипоксические тренировки приводили к умеренному ограничению площади иммунореактивности к HIF-3 α в нейронах на 13,5 % ($p < 0,05$) без статистически значимых изменений содержания белка ($p > 0,1$). На этом фоне в медиобазальном гипоталамусе отмечалось нарастание уровня мРНК к HIF-3 α в 8,6 раза, что указывало на общую для нейросекреторных нейронов активацию гена *hif-3 α* в ответ на гипоксический стимул.

Полученные данные свидетельствуют о том, что прерывистая гипоксия повышает экспрессию генов семейства *hif* и усиливает синтез белков HIF-1 α и HIF-3 α в пептидергических нейронах ПВЯ. Вероятно, что повышение экспрессии генов *hif* в данном случае можно рассматривать как сигнальный механизм активации пептидергических нейронов ПВЯ в ответ на гипоксический стимул. Действительно, ранее нами было установлено повышение уровня образования CRH и AVP в ПВЯ при действии гипоксической гипоксии [16–18]. Эти нейропептиды реализуют механизмы стероидогенеза и адаптации организма к действию стрессоров различного генеза [14,20]. В то же время угнетение синтеза белков семейства HIF в СОЯ свидетельствует о том, что AVP-синтезирующие нейроны СОЯ, по-видимому, не участвуют в механизмах адаптационного ответа на гипоксию. Это согласуется с ранее установленным фактом, что многодневная гипоксическая гипоксия приводит к дистрофическим измерениям в СОЯ [16,21]. Таким образом, мы полагаем, что активация генов семейства *hif* при многодневном действии гипоксической гипоксии может являться одним из молекулярных маркеров активации пептидергических нейронов нейросекреторных ядер гипоталамуса, участвующих в механизмах нейроэндокринного ответа на стресс. В этой связи эффективность гипоталамических механизмов адаптации к гипоксии, опосредованных HIF, была нами оценена через 10 дней после окончания ГТ.

Было установлено, что в постгипоксическом периоде уровень мРНК к HIF-1 α в медиобазальном гипоталамусе снижался в 5 раз ($p < 0,001$) по сравнению со сроком окончания ГТ, но оставался при этом в 2,5 раза ($p < 0,001$) выше, чем в контроле (табл. 1). В CRH/AVP-синтезирующих мелкоклеточных нейронах ммПВЯ сохранялись высокие показатели иммунореактивности к белку HIF-1 α , а его содержание составляло 80 % ($p < 0,05$) от показателя окончания ГТ, что было в 2 раза выше, чем в контроле. Сохранялись высокие параметры синтеза белка HIF-1 α в AVP-синтезирующих крупноклеточных нейронах злкПВЯ, в которых содержание белка хотя и снижалось на 45 % ($p < 0,002$) по сравнению с окончанием ГТ, но сохранялось на 85 % ($p < 0,001$) выше, чем в контроле. В крупноклеточных нейронах СОЯ в постгипоксический период содержание белка HIF-1 α не изменялось, хотя отмечалось некоторое восстановление параметров иммунореактивности к HIF-1 α , площадь которой возрастала на 20 % ($p < 0,002$) по отношению ко времени окончания ГТ.

Таблица 1. Показатели экспрессии HIF-1 α в медиобазальном гипоталамусе при действии прерывистой гипоксии (M \pm m)

Показатели	Группы животных		
	Контрольная	Гипоксические тренировки	Постгипоксический период
Площадь материала, иммунореактивного к HIF-1 α , в СОЯ (мкм ²)	4,835 \pm 0,357	2,601 \pm 0,113*	3,125 \pm 0,113**
Площадь материала, иммунореактивного к HIF-1 α , в злкПВЯ (мкм ²)	4,117 \pm 0,392	6,385 \pm 0,652*	5,116 \pm 0,584
Площадь материала, иммунореактивного к HIF-1 α , в ммПВЯ (мкм ²)	2,670 \pm 0,099	4,237 \pm 0,375*	4,553 \pm 0,312*
Содержание HIF-1 α в СОЯ (ЕиФ)	0,044 \pm 0,002	0,043 \pm 0,003	0,045 \pm 0,002
Содержание HIF-1 α в злкПВЯ (ЕиФ)	0,039 \pm 0,003	0,134 \pm 0,016*	0,073 \pm 0,008**
Содержание HIF-1 α в ммПВЯ (ЕиФ)	0,200 \pm 0,011	0,493 \pm 0,032*	0,396 \pm 0,033**
Содержание мРНК к HIF-1 α в медиобазальном гипоталамусе (y. e.)	1,000 \pm 0,431	12,805 \pm 1,527*	2,498 \pm 0,613**

*: достоверность отличий $p < 0,05$ по отношению к показателям контрольной группы; **: после гипоксических тренировок.

Таблица 2. Показатели экспрессии HIF-3 α в медиобазальном гипоталамусе при действии прерывистой гипоксии (M \pm m)

Показатели	Группы животных		
	Контрольная	Гипоксические тренировки	Постгипоксический период
Площадь материала, иммунореактивного к HIF-3 α в СОЯ (мкм ²)	2,865 \pm 0,164	2,476 \pm 0,108*	2,859 \pm 0,126*
Площадь материала, иммунореактивного к HIF-3 α в злкПВЯ (мкм ²)	2,882 \pm 0,169	5,859 \pm 0,548*	3,607 \pm 0,259**
Площадь материала, иммунореактивного к HIF-3 α в ммПВЯ (мкм ²)	2,351 \pm 0,077	2,615 \pm 0,152	3,309 \pm 0,140**
Содержание HIF-3 α в СОЯ (ЕиФ)	0,028 \pm 0,002	0,033 \pm 0,003	0,033 \pm 0,002*
Содержание HIF-3 α в злкПВЯ (ЕиФ)	0,030 \pm 0,002	0,090 \pm 0,009*	0,036 \pm 0,002**
Содержание HIF-3 α в ммПВЯ (ЕиФ)	0,146 \pm 0,008	0,253 \pm 0,017 *	0,264 \pm 0,016*
Содержание мРНК к HIF-3 α в медиобазальном гипоталамусе (y. e.)	1,000 \pm 0,258	8,565 \pm 0,838*	1,246 \pm 0,328

*: достоверность отличий $p < 0,05$ по отношению к показателям контрольной группы; **: после гипоксических тренировок.

В то же время концентрация мРНК к HIF-3 α в медиобазальном гипоталамусе в постгипоксический период снижалась до контрольных значений (табл. 2). При этом существенно уменьшалась площадь иммунореактивности к белку HIF-3 α и содержание самого белка в крупноклеточных нейронах злкПВЯ, хотя эти показатели оставались на 20–25 % выше, чем в контроле ($p < 0,05$). В СОЯ показатели площади иммунореактивности к белку HIF-3 α восстанавливались до контрольных значений, однако содержание самого белка в структуре не изменялось. В противоположность реакции крупноклеточных AVP-синтезирующих нейронов, в CRH/AVP-синтезирующих мелкоклеточных нейронах ммПВЯ площадь иммунореактивности к белку HIF-3 α продолжала увеличиваться на 26,5 % ($p < 0,001$) при сохранении показателей содержания белка на уровне значений, соответствующих окончанию ГТ.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что многодневное действие гипоксической гипоксии приводит к повышению экспрессии генов *hif-1 α* и *hif-3 α* и усилению синтеза белков HIF-1 α и HIF-3 α в пептидергических нейронах ПВЯ, но не в крупноклеточных нейронах СОЯ. Важно, что данный эффект в значительной мере сохранялся через 10 дней после окончания ГТ, а наиболее интенсивное увеличение содержания белков семейства HIF в ответ на гипоксию отмечалось в ммПВЯ. Как уже говорилось ранее, его мелкоклеточные нейроны ммПВЯ являются основным источником синтеза CRH в гипоталамусе и одновременно синтезируют AVP ко-пептид в CRH-ергических нейронах. Многие исследователи полагают, что уровень функциональной активности ПВЯ в значительной мере определяет успешность стратегии адаптации организма к стрессорам различного генеза, в том числе и к гипоксии [6, 12, 14, 17, 18]. Хотя доказательства прямого влияния HIF-1 α на синтез CRH в гипоталамусе

в открытом литературном доступе мы не обнаружили, но известно, что HIF-1 α активирует ген POMC в гипоталамических нейронах при гипоксии [22,23] так же, как и CRH – в гипоталамусе и аденогипофизе при стрессе [6,12]. При этом блокирование синтеза HIF-1 α в гипоталамических нейронах, синтезирующих POMC, приводит к дисбалансу энергического обмена в организме и способствует развитию ожирения гипоталамического генеза [23], а фармакологическая стимуляция образования HIF-1 α , напротив, повышает эффективность активации ГТАКС в ответ на острый стресс умеренной интенсивности [24].

Следует обратить внимание на тот факт, что умеренная гипоксическая нагрузка приводит к активации оксидативного и нитрозирующего стресса в нейронах [25], а тяжёлая гипоксия вызывает воспалительный процесс и апоптоз нейроцитов [26,27]. Однако даже кратковременная экспозиция в воздушной среде с 10 % содержанием O₂ повышает в нейронах концентрацию белков HIF-1 α [28] и HIF-3 α [29]. Считается, что продукция белка HIF-1 α является критически важной для адаптации клеток к гипоксии [4,8,9] и обеспечивает молекулярные механизмы адаптации мозга к гипоксии [28,30]. При этом HIF-1 α оказывает нейропротекторный эффект и стимулирует репарацию нервной ткани, повышая в ней пул сквенджеров свободных радикалов (гем-гидроксилазы-1, гем-оксигеназы-1) и факторов ангиогенеза (VEGF, VEGFR1, ангиопоэтин) [1,30–32]. В условиях гипоксии HIF-1 α является важным регулятором метаболизма глюкозы, активатором генов трансмембранных транспортёров глюкозы и ключевых ферментов гликолиза, что приводит к увеличению пула АТФ в нервных клетках [1]. При умеренной гипоксической нагрузке HIF-1 α оказывает мощный антиапоптотический эффект и уменьшает клеточную гибель при ишемии мозга [28,33].

Для клеток млекопитающих характерна ко-локализация обеих изоформ белка HIF [34], однако при гипоксии концентрация HIF-1 α повышается в основном в цитоплазме нейронов [28], а уровень HIF-3 α увеличивается главным образом в клеточном ядре [34]. Данная особенность может быть обусловлена спецификой взаимного участия обеих изоформ HIF в молекулярных механизмах адаптации к гипоксии по принципу отрицательной обратной связи. Так, белок HIF-1 α может влиять на экспрессию гена *hif-3 α* , а белок HIF-3 α , как правило, тормозит синтез HIF-1 α [4,8,9]. Однако ген *hif-1 α* – всего лишь одна из мишеней для белка HIF-3 α . Помимо регулирования транскрипции специфичных для HIF-3 α целевых генов, существует большая группа генов, однонаправленная регуляция которых характерна для обеих изоформ белка HIF. В частности, это гены, регулирующие катаболизм моносахаридов, р53-опосредованные процессы клеточного апоптоза, механизмы индукции оксидативного стресса и антиоксидантной защиты [3,5]. В настоящем исследовании установлено, что гипоксические тренировки приводили к более интенсивному накоплению белка HIF-1 α в нейронах ПВЯ, содержание которого в 2 раза превышало соответствующие значения HIF-3 α в мПВЯ и на 50 % – в злПВЯ. Следовательно, повышение концентрации белка HIF-3 α в гипоталамусе не обязательно должно приводить к торможению активности гена *hif-1 α* и, значит, к выключению активности генов, регулируемых белком HIF-1 α .

Таким образом, проведенные исследования показали, что белки HIF могут играть важную роль в молекулярных механизмах регуляции физиологической функции пептидергических нейронов гипоталамуса в ответ на гипоксический стимул. Вероятно, что изменение экспрессии генов *hif* и соотношения пула белков семейства HIF в нейронах может модулировать интенсивность синтеза тех ключевых гипоталамических нейропептидов, которые определяют функциональную активность гипоталамуса и периферических эндокринных желез, и, соответственно, адаптивную возможность организма к гипоксии. В то же время сохранение высоких показателей экспрессии гена *hif-1 α* в паравентрикулярном ядре гипоталамуса в постгипоксический период свидетельствует о формировании системного структурного следа адаптации к гипоксии и, следовательно, эффективности предложенного режима гипоксических тренировок с целью повышения общей резистентности организма.

Выводы

1. Прерывистая гипобарическая гипоксия приводит к повышению синтеза мРНК к HIF-1 α и HIF-3 α , а также самих белков в котриколиберин- и вазопресинергических нейронах паравентрикулярного ядра гипоталамуса.

2. Гипоксические тренировки снижают уровень образования белков HIF-1 α и HIF-3 α в крупноклеточных нейронах супраоптического ядра.

3. Основные показатели повышения функциональной активности нейронов паравентрикулярного ядра гипоталамуса сохраняются на протяжении 10 дней после окончания действия прерывистой гипоксии.

Список литературы

- [1] Zagórska A. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing / A. Zagórska, J. Dulak // Acta Biochimica Polonica. – 2004. – Vol. 51. – №3. – P. 563–585.
- [2] Majmudar A. J. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress / A. J. Majmudar, W. J. Wong, M. C. Simon // Mol Cell. – 2010. – Vol. 40. – P. 294–309.
- [3] Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia / P. Zhang, Q. Yao, L. Lu, et al. // Cell Reports. – 2014. – Vol. 6. – P. 1110–1121.
- [4] Yang H.-L. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function / H.-L. Yang, W. Chao, Z.-F. Xiong, X. Fang // Mol. Med. Reports. – 2015. – Vol. 12. – P. 2411–2416.
- [5] Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes / C. Duan // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2016. – Vol. 310. – P. C260–C269.
- [6] Charmandari E. Endocrinology of the stress response / E. Charmandari, C. Tsigos, G. Chrousos // Annu. Rev. Physiol. – 2005. – Vol. 67. – P. 259–284.
- [7] Prabhakar N. R. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2 / N. R. Prabhakar, G. L. Semenza // Physiol Rev. – 2012. – Vol. 92. – P. 967–1003.
- [8] Pugh C. W. Modulation of the Hypoxic Response / C. W. Pugh // Adv. Exp. Med. Biol. – 2016. – Vol. 903. – P. 259–271.
- [9] Lee H.-C. Endocrine targets of hypoxia-inducible factors / H.-C. Lee, S.-J. Tsai // J. Endocrinology. – 2017. – Vol. 234. – P. R53–R65.
- [10] Swanson L. W. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei / L. W. Swanson, P. E. Sawchenko // Ann. Rev. Neurosci. – 1983. – Vol. 6. – P. 269–324.
- [11] The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved / J. J. Bonfiglio, C. Inda, D. Refojo, et al. // Neuroendocrinology. – 2011. – Vol. 94. – P. 12–20.
- [12] Kovacs K. J. CRH: The link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress / K. J. Kovacs // J. Chem. Neuroanat. – 2013. – Vol. 54. – P. 25–33.
- [13] Меерсон Ф. Адаптация, стресс и профилактика / Ф. Меерсон. – М.: Наука, 1981. – 279 с.
- [14] McEwen B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain / B. S. McEwen // Physiol. Rev. – 2007. – Vol. 87. – P. 873–904.
- [15] Silverman A. J. Magnocellular neurosecretory system / A. J. Silverman, E. A. Zimmerman // Ann. Rev. Neurosci. – 1983. – Vol. 6. – P. 357–380.
- [16] Абрамов А. В. Влияние гипоксии на функциональное состояние нейросекреторной системы гипоталамуса крыс / А. В. Абрамов, Ю. М. Колесник // Физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 1992. – Т. 78. – №7. – С. 21–27.
- [17] Абрамов А. В. Влияние интервальных гипоксических тренировок на функциональное состояние пептидергических нейронов паравентрикулярного ядра гипоталамуса и нейронов ствола мозга крыс / А. В. Абрамов // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 1998. – Т. 84. – №3. – С. 173–181.
- [18] Kolesnik Yu. M. Effect of Intermittent Hypoxia Trainings on the Functional State of Corticotropin releasing hormone- and β -Endorphin-Synthesizing Neurons of the Rat Paraventricular Nucleus of Hypothalamus / Yu. M. Kolesnik, E. V. Kadzharyan, A. V. Abramov // Int. J. Physiol. Pathophysiol. – 2014. – Vol. 5. – Issue 4. – P. 291–297.
- [19] Гайдышев И. П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++ / И. П. Гайдышев. – СПб.: БХВ-Петербург, 2004. – 504 с.
- [20] Tsigos C. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress / C. Tsigos, G. P. Chrousos // J. Psychosomatic Res. – 2002. – Vol. 53. – P. 865–871.
- [21] Шаменко В. А. Морфогистохимическая характеристика нейронов супраоптического ядра гипоталамуса крыс при действии прерывистой гипоксии / В. А. Шаменко // Ежемесячный научный журнал Фонда «Биолог». – 2014. – №4. – С. 29–32.
- [22] Virtue S. Nothing Iffy about HIF in the Hypothalamus / S. Virtue, A. Vidal-Puig // PLoS Biol. – 2011. – Vol. 9. – №7. – P. e1001116.
- [23] Hypoxia-Inducible Factor Directs POMC Gene to Mediate Hypothalamic Glucose Sensing and Energy Balance Regulation / H. Zhang, G. Zhang, F. J. Gonzalez, et al. // PLoS Biol. – 2011. – Vol. 9. – №7. – P. e1001112.
- [24] Harrell C. S. Pharmacological stimulation of Hypoxia Inducible Factor-1 α facilitates the corticosterone response to a mild acute stressor / C. S. Harrell, S. A. Rowson, G. N. Neigh // Neurosci. Lett. – 2015. – Vol. 600. – P. 75–79.
- [25] Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain / P. Maiti, S. B. Singh, A. K. Sharma, et al. // Neurochemistry International. – 2006. – Vol. 49. – P. 709–716.

- [26] Doyle K. P. Mechanisms of ischemic brain damage / K. P. Doyle, R. P. Simon, M. P. Stenzel-Poore // *Neuropharmacology*. – 2008. – Vol. 55. – №3. – P. 310–318.
- [27] Pathogenic mechanisms following ischemic stroke / S. E. Khoshnam, W. Winlow, M. Farzaneh, et al. // *Neurol. Sci.* – 2017. – Vol. 38. – №7. – P. 1167–1186.
- [28] Brain adaptation to hypoxia and hyperoxia in mice / L. Terraneo, R. Paroni, P. Bianciardi, et al. // *Redox Biology*. – 2017. – Vol. 11. – P. 12–20.
- [29] Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3alpha expression in lung epithelial cells. Characterization and comparison with HIF-1alpha / Q. F. Li, X. R. Wang, Y. W. Yang, H. Lin // *Cell Res.* – 2006. – Vol. 16. – P. 548–558.
- [30] Hypoxia inducible factor-1 alpha stabilization for regenerative therapy in traumatic brain injury / M. Khan, H. Khan, I. Singh, A. K. Singh // *Neural Regen. Res.* – 2017. – Vol. 12. – №5. – P. 696–701.
- [31] Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) is required for neural stem cell maintenance and vascular stability in the adult mouse SVZ / L. Li, K. M. Candelario, K. Thomas, et al. // *J. Neurosci.* – 2014. – Vol. 34. – P. 16713–16719.
- [32] Sun Y. Neuroprotective mechanism of HIF-1 α overexpression in the early stage of acute cerebral infarction in rats / Y. Sun, W. He, L. Geng // *Exp. Therapeutic Medicine*. – 2016. – Vol. 12. – P. 391–395.
- [33] Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? / J. P. Piret, D. Mottet, M. Raes, C. Michiels // *Biochem. Pharmacology*. – 2002. – Vol. 64. – Issue 5–6. – P. 889–892.
- [34] The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3alpha gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction / T. Tanaka, M. Wiesener, W. Bernhardt, et al. // *Biochem. J.* – 2009. – Vol. 424. – P. 143–151.

References

- [1] Zagórska, A., & Dulak, J. (2004) HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimica Polonica*, 51(3), 563–585. doi: 045103563.
- [2] Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (2010) Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*, 40, 294–309. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.022.
- [3] Zhang, P., Yao, Q., Lu, L., Li, Y., Chen, P. J., & Duan, C. (2014) Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia. *Cell Reports*, 6, 1110–1121. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.011.
- [4] Yang, H. -L., Chao, W., Xiong, Z. -F., & Fang, X. (2015) Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function. *Mol. Med. Reports*, 12, 2411–2416. doi: 10.3892/mmr.2015.3689.
- [5] Duan, C. (2016) Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 310, C260–C269. doi: 10.1152/ajpcell.00315.2015.
- [6] Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005) Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 259–284. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816.
- [7] Prabhakar, N. R., & Semenza, G. L. (2012) Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev.*, 92, 967–1003. doi: 10.1152/physrev.00030.2011.
- [8] Pugh, C. W. (2016) Modulation of the Hypoxic Response. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 903, 259–271. doi: 10.1007/978-1-4899-7678-9_18.
- [9] Lee, H. -C., & Tsai, S. -J. (2017) Endocrine targets of hypoxia-inducible factors. *J. Endocrinology*, 234, R53–R65. doi: 10.1530/JOE-16-0653.
- [10] Swanson, L. W., & Sawchenko, P. E. (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann. Rev. Neurosci.*, 6, 269–324. doi: 10.1146/annurev.ne.06.030183.001413.
- [11] Bonfiglio, J. J., Inda, C., Refojo, D., Holsboer, F., Arzt, E., & Silberstein, S. (2011) The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved. *Neuroendocrinology*, 94, 12–20. doi: 10.1159/000328226.
- [12] Kovacs, K. J. (2013) CRH: The link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. *J. Chem. Neuroanatomy*, 54, 25–33. doi: 10.1016/j.jchemneu.2013.05.003.
- [13] Meerson, F. Z. (1981) *Adaptacija, stress i profilaktika [Adaptation, stress and prevention]*. Moscow: Nauka. [in Russian].
- [14] McEwen, B. S. (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev.*, 87, 873–904. doi: 10.1152/physrev.00041.2006.
- [15] Silverman, A. J., & Zimmerman, E. A. (1983) Magnocellular neurosecretory system. *Ann. Rev. Neurosci.*, 6, 357–380. doi: 10.1146/annurev.ne.06.030183.002041.
- [16] Abramov, A. V., & Kolesnik, Yu. M. (1992) Vliyanie gipoksii na funkcionálnoe sostoyanie neyrosekretornoj sistemy gipotalamusa krysa [Influence of hypoxia on the functional state of peptidergic neurons of the neurosecretory system of the rat hypothalamus]. *Fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, 78(7), 21–27. [in Russian].
- [17] Abramov, A. V. (1998) Vliyanie interval'nykh gipoksicheskikh trenirovok na funkcionálnoe sostoyanie peptidergicheskikh neyronov paraventriculjarnogo yadra gipotalamusa i neyronov stvola mozga krysa [Influence of interval hypoxic training on the functional state of peptidergic neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus and neurons of the rat brain stem]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, 84(3), 173–181. [in Russian].
- [18] Kolesnik Yu.M., Kadzharyan E.V., Abramov A.V. (2014) Effect of Intermittent Hypoxia Trainings on the Functional State of Corticotropin releasing hormone- and β -Endorphin-Synthesizing Neurons of the Rat Paraventricular Nucleus of Hypothalamus. *Int. J. Physiol. Pathophysiology*, 5(4), 291–297. doi: 10.1615/IntJPhysPathophys.v5.i4.20.
- [19] Gajdyshev, I. P. (2004) *Reshenie nauchnykh i inzhenernykh zadach sredstvami Excel, VBA i C/C++*. [Solution of scientific and engineering problems by means of Excel, VBA and C/C++]. Saint Petersburg [in Russian].
- [20] Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosomatic Res.*, 53, 865–871. doi: 10.1016/S0022-3999(02)00429-4.
- [21] Shamenko, V. O. (2014) Morfogistokhimicheskaya kharakteristika neyronov supraopticheskogo yadra gipotalamusa krysa pri dejstvii preryvistoj gipoksii [The morpho-histochemical characteristics of neurons of supraoptic nucleus of the rat hypothalamus under intermittent hypoxia]. *Ezhemesyachnyj nauchnyj zhurnal Fonda «Biolog»*, 4, 29–32 [in Russian].
- [22] Virtue, S., & Vidal-Puig, A. (2011) Nothing iffy about HIF in the Hypothalamus. *PLoS Biol.*, 9(7), e1001116. doi: 10.1371/journal.pbio.1001116.
- [23] Zhang, H., Zhang, G., Gonzalez, F. J., Park, S., & Cai, D. (2011) Hypoxia-Inducible Factor Directs POMC Gene to Mediate Hypothalamic Glucose Sensing and Energy Balance Regulation. *PLoS Biol.*, 9(7), e1001112. doi: 10.1371/journal.pbio.1001112.
- [24] Harrell, C. S., Rowson, S. A., & Neigh, G. N. (2015) Pharmacological stimulation of Hypoxia Inducible Factor-1 α facilitates the corticosterone response to a mild acute stressor. *Neurosci Lett*, 600, 75–79. doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.051.
- [25] Maiti, P., Singh, S. B., Sharma, A. K., Muthuraju, S., Banerjee, P. K., & Ilavazhagan, G. (2006) Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochemistry International*, 49, 709–716. doi: 10.1016/j.neuint.2006.06.002.
- [26] Doyle K. P., Simon, R. P., & Stenzel-Poore, M. P. (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55(3), 310–318. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.01.005.
- [27] Khoshnam, S. E., Winlow, W., Farzaneh, M., Farbood, Y., & Moghadam, H. F. (2017) Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol. Sci.*, 38(7), 1167–1186. doi: 10.1007/s10072-017-2938-1.
- [28] Terraneo, L., Paroni, R., Bianciardi, P., Giallongo, T., Carelli, S., Gorio, A., & Samaja, M. (2017) Brain adaptation to hypoxia and hyperoxia in mice. *Redox Biology*, 11, 12–20. doi: 10.1016/j.redox.2016.10.018.
- [29] Li, Q. F., Wang, X. R., Yang, Y. W., & Lin, H. (2006) Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3alpha expression in lung epithelial cells: Characterization and comparison with HIF-1alpha. *Cell Res.*, 16(6), 548–558. doi: 10.1038/sj.cr.7310072.
- [30] Khan, M., Khan, H., Singh, I., & Singh, A. K. (2017) Hypoxia inducible factor-1 alpha stabilization for regenerative therapy in traumatic brain injury. *Neural Regen. Res.*, 12(5), 696–701. doi: 10.4103/1673-5374.206632.
- [31] Li, L., Candelario, K. M., Thomas, K., Wang, R., Wright, K., Messier, A., & Cunningham, L. A. (2014) Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) is required for neural stem cell maintenance and vascular stability in the adult mouse SVZ. *J. Neurosci.*, 34, 16713–16719. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4590-13.2014.
- [32] Sun, Y., He, W., & Geng, L. (2016) Neuroprotective mechanism of HIF-1 α overexpression in the early stage of acute cerebral infarction in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(1), 391–395. doi: 10.3892/etm.2016.3288.
- [33] Piret, J. P., Mottet, D., Raes, M., & Michiels, C. (2002) Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem. Pharmacology*, 64(5–6), 889–892. doi: 10.1016/S0006-2952(02)01155-3.
- [34] Tanaka, T., Wiesener, M., Bernhardt, W., Eckardt, K. U., & Warnecke, C. (2009) The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3alpha gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *Biochem. J.*, 424, 143–151. doi: 10.1042/BJ20090120.

Сведения об авторах:

Абрамов А. В., д-р мед. наук, профессор каф. патологической физиологии, руководитель учебного медико-лабораторного центра, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.
Шаменко В. А., ассистент каф. детских болезней ФПО, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Відомості про авторів:

Абрамов А. В., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології, керівник навчального медико-лабораторного центру, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Шаменко В. О., асистент каф. дитячих хвороб ФПО, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Information about authors:

Abramov A. V., MD, PhD, DSc, Professor, Professor of the Department of Pathological Physiology, Head of Scientific Medical-Laboratory Center, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
Shamenko V. A., MD, Assistant of the Department of Children Diseases of FPE, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Конфликт интересов: отсутствует.

Conflicts of Interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 05.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 10.05.2017

Прийнято до друку / Accepted: 12.05.2017