

ИССЛЕДОВАНИЕ НІF-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС

Древицкая Т.И., Линник О.А., Досенко В.Е., Маньковская И.Н.

Институт физиологии им. А.А.Богомольца, НАНУ, г. Киев, Украина

drevitskaya@biph.kiev.ua

В настоящее время понимание молекулярно-генетических механизмов ответа на оксидативный стресс различного генеза составляет фундаментальный аспект физиологии. Известно, что транскрипционный фактор HIF играет важную роль в регуляции продукции ROS (активные формы кислорода) в митохондриях благодаря разным механизмам: прямым – регуляция биогенеза и аутофагии митохондрий, перестройка паттерна экспрессии субъединиц цитохрома с оксидазы, а также косвенным – регуляция экспрессии PDK-1, которая фосфорилирует и инактивирует пируватдегидрогеназу. В частности, при индуцированной гипоксией аутофагии именно HIF-1 регулирует экспрессию протеина BNIP3, потенциального индуктора митофагии. При исследовании HIF-опосредованой регуляции митохондриального метаболизма показано, что при гипоксии и, соответственно, при увеличении продукции ROS митохондриями повышается экспрессия HIF-1 α и его генов-мишеней. Так, Lee и др. считают, что доксорубицин обладает способностью ингибировать HIF-1 из-за блокирования его связывания с ДНК [1]. Итак, с одной стороны, HIF-1 приводит к развитию клеточного ответа на гипоксию путем активного снижения потребления кислорода в митохондриях, при гипоксических условиях стимулирует гликолитические процессы в клетке и запускает процесс аутофагии через BNIP3. С другой стороны, HIF-1 влияет на экспрессию miR-210, которая способна снижать уровень апоптоза и регулировать экспрессию субъединицы COX-4, которая связана с активностью цитохрома с-оксидазы, продукцией АТФ и образованием ROS в митохондриях, то есть HIF-1 регулирует гомеостатический ответ, оптимизирует функцию митохондриального дыхания при снижении РО₂ и повышает генерацию ROS в клетках [2].

Целью данной работы было исследование эффектов активации и подавления системы HIF и его генов-мишеней на функцию митохондрий, распределение разных видов клеточной смерти и про-/антиоксидантный баланс неонатальных кардиомиоцитов.

Исследование проведено на изолированных кардиомиоцитах двухдневных неонатальных крысах линии Вистар. Выделение и культивирование неонатальных кардиомиоцитов осуществляли в соответствии с модифицированной методикой [3]. Распределение видов клеточной смерти в условиях активации HIF и при его инактивации оценивалось при

моделировании оксидативного повреждения с помощью аноксии-реоксигенации. Для подсчета количества живых, некротических и апоптотических клеток использовали методы окраски бис-бензимидом (Hoechst 33342) и пропидиум йодидом в концентрации 8,75 мкмоль/л и флуоресцентной микроскопии (NikonEclipse E200, фильтр D/PI, длина волны возбуждения 330-380 и 510-560 нм для Hoechst и пропидиум йода, соответственно). Митохондриальный потенциал определяли с помощью окраски MitoTracker®Deep Red FM (Invitrogen, USA). Профиль экспрессии субъединиц HIF и ряда HIF-зависимых генов изучали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Анализ полученных результатов экспрессии генов проводили с помощью программного обеспечения 7500 FastReal-time PCR Software.

При использовании доксорубициновой модели подавления HIF показано, что количество живых клеток снизилось на $20,8 \pm 4,3\%$ по сравнению с контролем, соответственно, количество кардиомиоцитов, погибших путем некроза, увеличилось на $20,7 \pm 4$, уровень апоптотических клеток не изменился. При оценке изменений экспрессии ряда генов после инкубации с доксорубицином в дозе 0,5 мкмоль установлено, что уровень экспрессии мРНК HIF-1 α составил $2,9 \pm 0,8$ у.е., в контроле – $3,6 \pm 0,7$ у.е. Уровень экспрессии генов-мишеней HIF (TERT и PDK-1) достоверно ($p < 0,05$) уменьшился (в 4,9 и 4 раза, соответственно) по сравнению с контролем.

Показано, что ингибитор HIF-пролилгидроксилаз, который использовали для активации системы HIF, который вносился в среду для культивирования в конечной концентрации 2,5 мкм за 24 часа до аноксии-реоксигенации, уменьшал количество кардиомиоцитов, погибших путем некроза, на 13,1%, и увеличивал количество живых клеток на 14%. Также определяли изменения профиля экспрессии мРНК субъединиц HIF и ряда HIF-зависимых генов: содержание мРНК субъединиц HIF-1 α , HIF-2 α и HIF-3 α увеличилось, соответственно, в 3,07; 3,9 и 4,7 раза ($P < 0,05$) по сравнению с контролем; уровень экспрессии мРНК гена эритропоэтина и его рецептора увеличился в 4,1 и в 4,5 раза ($P < 0,05$), соответственно; уровень экспрессии матричной РНК гена IGF-1 увеличился в 5,2 раза, Glut-1 в 10 раз, Glut-4 в 6 раз при использовании ингибитора ($P < 0,05$). Кроме того, исследовали изменения экспрессии HIF-зависимой гистона-деацетилазы HDAC7: при действии ингибитора пролил-гидроксилазы ее экспрессия в культуре неонатальных кардиомиоцитов увеличилась в 4 раза.

Таким образом, установлены возможные молекулярно-генетические механизмы кардиопротекции, которые обусловлены изменением профиля экспрессии HIF-зависимых генов, в том числе цитопротекторных факторов (EPO и EpoR), белков энергетического обмена (IGF-1, Glut-1, Glut-4) и фермента, который ограничивает экспрессию других генов в условиях недостатка кислорода, окислительного стресса и энерго-дефицита путем деацетилирования гистонов в промоторных участках

(HDAC7), что, несомненно, является компенсаторной реакцией в ответ на аноксию-реоксигенацию *in vitro*. Активация системы транскрипционного фактора HIF с помощью ингибитора пролилгидроксилаз (PHD) приводила к уменьшению некротической гибели клеток, скорее всего, из-за снижения уровня продукции свободных радикалов, что открывает перспективы использования его активаторов для коррекции состояний, связанных с повышением свободнорадикального окисления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee K., Qian D., Rey S., Wei H., Liu J., Semenza G. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells // Proc. Nat. Acad. Sci. U S A. – 2009. – Vol. 106, № 7. – P. 2353-2358.
2. Линник О. А., Древицкая Т. И., Чорный С. А., Досенко В. Е., Маньковская И. Н. Влияние доксорубицина на культуру изолированных кардиомиоцитов крыс // Вісник морфології. – 2014. – Т. 18, № 2. – С. 383-387.
3. Surova O., Nagibin V., Tumanovskaya L., Dosenko V., Moibenko A. Effect of a low dose of proteasome inhibitor on cell death and gene expression in neonatal rat cardiomyocyte cultures exposed to anoxia-reoxygenation // Exp. Clin. Cardiol. – 2009. – Vol. 14, № 2. – P. 57-61.

ЙОДСОДЕРЖАЩИЕ ТИРЕОИДНЫЕ ГОРМОНЫ ПОВЫШАЮТ АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ ОРГАНИЗМА ЗА СЧЕТ СТИМУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ РАННИХ ГЕНОВ

Евдокимова О.В., Городецкая И.В.

Витебский государственный медицинский университет, Витебск
gorodecka-iv@mail.ru

Установлено, что близкие к физиологическим дозы йодсодержащих тиреоидных гормонов (ЙТГ) способны оказывать стресс-протекторное действие за счет ограничения интенсификации перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сердце при долговременном действии стрессоров. Указанное лимитирование липопероксидации обусловлено повышением активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ). Однако механизм влияния ЙТГ на состояние про-/антиоксидантного баланса организма до сих пор не изучен. Учитывая возможность геномного действия ЙТГ, предположено, что их антистрессорный эффект связан со стимуляцией синтеза некоторых генов, в частности генов раннего ответа *c-fos* и *c-jun*, экспрессия которых является незамедлительным и неспецифическим ответом организма на действие разных стрессоров.