

Д.А. Маркуц

## ГИПОКСИЯ-ИНДУЦИРУЕМЫЙ ФАКТОР: РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Научный руководитель канд. мед. наук Юшкевич П.Ф.

Кафедра патологической физиологии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

**Резюме.** Организм человека поддерживает парциальное давление кислорода в крови в узких физиологических границах. Несоответствие между потребностью тканей в кислороде и их кислородным обеспечением имеет место при различных заболеваниях. Важнейшую роль в развитии ответной реакции клеток на гипоксию играет кислородчувствительный протеиновый комплекс с транскрипционной активностью – гипоксия-индуцируемый фактор (HIF).

**Ключевые слова:** гипоксия, гипоксия-индуцируемый фактор (HIF).

**Resume.** The human body supports the oxygen partial pressure in the blood within the narrow physiologic limits. Discrepancy between tissue oxygen demand and oxygen supply takes place in different diseases. Major role in the development of the response of cells to hypoxia plays an oxygen-sensitive protein complex with the transcriptional activity - hypoxia-inducibile factor (HIF).

**Keywords:** hypoxia, hypoxia-inducibile factor (HIF).

**Актуальность.** Гипоксия-индуцируемые факторы (HIF) – это факторы транскрипции, которые реагируют на изменения в доступном кислороде в клеточной среде, а именно, на снижение количества кислорода, или гипоксию.

HIF, стабилизированные в условиях гипоксии, связываются с HIF-восприимчивыми элементами ДНК (HREs) и активируют некоторые гены, что спо-

способствует выживанию клетки в условиях с низким содержанием кислорода. На основе активации генов синтезируются ферменты гликолиза, переносчики глюкозы, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), эритропоэтин (EPO).

Согласно современным представлениям, экспрессия HIF имеет важное значение в патогенезе различных заболеваний, в частности ишемической болезни сердца. Кроме того, предполагается роль активации HIF в механизмах реализации кардиопротекторных эффектов дистантного ишемического пре- и посткондиционирования.

Дистантное ишемическое преко́ндиционирование (ДИПК) – явление, характеризующееся повышением устойчивости миокарда к ишемическому и реперфузионному повреждению после ишемии и реперфузии анатомически удаленных от сердца органов и тканей (скелетная мышца, тонкая кишка, почка), которые осуществляются до длительной ишемии миокарда. G. Andreka et al. (2007) в экспериментах на свиньях продемонстрировали ограничение размеров зоны некроза миокарда при воздействии четырьмя последовательными 5-минутными эпизодами ишемии/реперфузии задней конечности, осуществляемыми непосредственно после окончания окклюзии инфаркт-связанной коронарной артерии. Этот феномен получил название – дистантное ишемическое посткондиционирование (ДИПостК) [2].

**Цель:** выяснение роли экспрессии HIF в условиях гипоксии в патогенезе различных заболеваний, а также изучение противоишемической и антиаритмической эффективности дистантного ишемического пре- и посткондиционирования при ишемии и реперфузии миокарда у крыс.

**Задачи:**

1. Выяснить роль экспрессии HIF в условиях гипоксии в патогенезе различных заболеваний.
2. Изучить противоишемическую и антиаритмическую эффективность дистантного ишемического пре- и посткондиционирования при ишемии и реперфузии миокарда у крыс.

**Материал и методы.** Для изучения противоишемической и антиаритмической эффективности дистантного ишемического пре- и посткондиционирования при ишемии и реперфузии миокарда были выполнены опыты на 30 наркотизированных нелинейных белых крысах-самцах, масса которых составляла 200–250 г., а возраст – 4±1 мес. В исследовании использовалась модель острой коронарной недостаточности, предложенная С. Clark et al. (1980) [3].

Для наркотизации животных применяли тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг внутривенно с последующей внутривенной инфузией в левую общую яремную вену поддерживающей дозы 10 мг/кг/час с помощью инъекционного насоса В. Braun (Германия). Крыс переводили на искусственное дыхание атмосферным воздухом через трахеостому при помощи аппарата ИВЛ Harvard (Великобритания) с частотой дыхания 56-60 в минуту и дыхательным объемом 1,0-1,2 мл/100 г. массы тела животного. Наличие проходимости дыхательных путей контролировалось по давлению в трахее, нормальным значением которого на вдохе считалось 10-15 мм рт. ст. В хо-

де экспериментов непрерывно регистрировались ЭКГ во II стандартном отведении и системное артериальное давление (АД). Для измерения АД прямым методом крысам канюлировали правую общую сонную артерию. Ректальная температура у крыс измерялась электротермометром Harvard (Великобритания) и поддерживалась электрогрелкой на уровне  $37,0 \pm 0,5$  °С.

Грудную клетку наркотизированного животного вскрывали в четвертом межреберном промежутке слева. После периода 15-минутной стабилизации гемодинамики крысам всех экспериментальных групп выполняли 30-минутную окклюзию передней нисходящей коронарной артерии (ПНКА) путем механического ее пережатия при помощи фишки. Окклюзия артерии подтверждалась цианозом ишемизированной области, снижением АД примерно на 10-20 мм рт. ст. и подъемом сегмента ST на ЭКГ. Реперфузия миокарда достигалась удалением фишки, ее продолжительность составляла 120 минут. Реперфузия миокарда подтверждалась исчезновением цианоза и возвращением сегмента ST к изолинии.

ДИПК и ДИПостК воспроизводили путем 15-минутной окклюзии обеих бедренных артерий наложением лигатуры, которое осуществлялось за 25 мин до и через 10 мин после 30-минутной ишемии миокарда соответственно.

Таким образом, все экспериментальные животные были разделены на 3 группы. У животных контрольной группы (Контроль, n=10) выполняли только 30-минутную окклюзию ПНКА и 120-минутную реперфузию миокарда. Животные опытных групп (ДИПК, n=10 и ДИПостК, n=10) дополнительно подвергались воздействию 15-минутной окклюзии обеих бедренных артерий.

Зону риска определяли с помощью внутривенного введения в левую общую яремную вену 0,5 мл 5 % раствора синьки Эванса (Sigma, США) в конце периода реперфузии миокарда при кратковременной повторной окклюзии ПНКА. При этом зона риска оценивалась как не окрашенная в синий цвет.

Для идентификации зоны некроза в миокарде левого желудочка крыс использовали метод, основанный на определении активности дегидрогеназ, предложенный M. Fishbein et al. (1981) [4]. С этой целью срезы миокарда левого желудочка помещали в 1 % раствор трифенилтетразолия хлорида на 15 минут при температуре 37° С. При этом жизнеспособный миокард (клетки, сохранившие дегидрогеназную активность) окрашивался в кирпично-красный цвет, а некротизированная ткань была белесой.

Для оценки антиаритмической эффективности ДИПК подсчитывалась общая длительность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной ишемии миокарда.

Полученные в исследовании результаты анализировались с использованием стандартных пакетов статистических программ Statistica 8.0 и GraphPad Prism. Статистическую значимость различий полученных данных в случае их параметрического распределения оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием теста множественных сравнений Данна. Результаты ис-

следования при их параметрическом распределении представлялись в виде: среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ). Для оценки статистической значимости различий данных в случае их непараметрического распределения использовали критерий Крускала-Уоллиса и тест множественных сравнений Данна. При непараметрическом распределении результаты исследования были представлены в виде: медиана и интерквартильный размах (25-й; 75-й процентиля). Уровень  $p < 0,05$  рассматривался как статистически значимый.

**Результаты и их обсуждение.** Роль HIF в патогенезе ишемических кардиоваскулярных заболеваний.

Активация HIF оказывает кардиопротекторный эффект при ишемической болезни сердца [2]. Ишемия миокарда вызывает экспрессию VEGF в сердце человека. Снижение продукции VEGF связано со снижением активности HIF-1. Поэтому стратегия выбора терапии с целью повышения экспрессии HIF-1 $\alpha$  может способствовать ангиогенезу в ишемизированном миокарде. Другой механизм, с помощью которого HIF-1 опосредует кардиопротекцию, является изменение баланса между гликолитическим метаболизмом и окислительным фосфорилированием в ишемизированном миокарде. HIF-1 скоординировано активирует транскрипцию генов, кодирующих образование переносчиков глюкозы и ферментов гликолиза. Повышенный гликолиз позволяет клеткам поддерживать уровень АТФ в условиях гипоксии. HIF-1 ингибирует митохондриальный окислительный метаболизм, тем самым снижая образование активных форм кислорода в условиях гипоксии.

Предполагается роль HIF в механизмах реализации кардиопротекторных эффектов ДИПК и ДИПостК. В частности показано, что продукция аденозина, опосредуемая HIF-1, способствует развитию кардиопротекторных эффектов ДИПК и ДИПостК. Обусловленная HIF-1 экспрессия NO-синтазы, может вызывать продукцию NO в ответ на воспроизведение данных феноменов, защищая миокард от фатального ишемического повреждения [2]. Кроме того, HIF активно влияет на продукцию эритропоэтина, который защищает кардиомиоциты от апоптоза после ишемии-реперфузии [2].

При выполнении опытов по изучению кардиопротекторной эффективности ДИПК и ДИПостК установлено, что длительность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной ишемии миокарда у крыс в группе Контроль составила 198 (14; 239) с, в группе ДИПК – 30 (3; 133) с ( $p < 0,05$  по сравнению с группой Контроль), а в группе ДИПостК – 153 (109; 166) с. Таким образом, в группе крыс, в которой воспроизводили ДИПК, имеет место статистически значимое снижение длительности ишемических нарушений сердечного ритма по сравнению с животными контрольной группы, что свидетельствует об антиаритмической эффективности ДИПК при острой коронарной недостаточности у крыс.

У экспериментальных животных отмечались следующие размеры зоны риска в миокарде левого желудочка (в % от массы левого желудочка): в группе Контроль –  $45 \pm 3$  %, в группе ДИПК –  $47 \pm 5$  %, в группе ДИПостК –  $50 \pm 3$  %. Следовательно, в

анализируемых группах крыс при ишемии и реперфузии миокарда выявлены сопоставимые размеры зоны риска в миокарде левого желудочка.

Размер зоны некроза в миокарде левого желудочка (в % от массы зоны риска) у крыс в группе Контроль составил  $46 \pm 4$  %, в группе ДИПК –  $19 \pm 1$  % ( $p < 0,01$  по сравнению с группой Контроль), в группе ДИПостК –  $25 \pm 2$  % ( $p < 0,01$ ). Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о противоишемической эффективности ДИПК и ДИПостК при ишемии и реперфузии миокарда у крыс.

Роль HIF в патогенезе атеросклероза.

Активация HIF-1 в тучных клетках стимулирует экспрессию VEGF. Этот фактор прямо или косвенно привлекает воспалительные клетки в интиму сосуда на различных стадиях атерогенеза. Утолщение интимы, снижение кровоснабжения из-за высокого давления в материнском сосуде, индуцированное сужение vasa vasorum и активный метаболизм воспалительных клеток вместе способствуют гипоксии в атеросклеротических сосудах [5]. Кислород-недостаточная микросреда во внутренних слоях сосудистой стенки дополнительно индуцирует ангиогенез посредством активации HIF и VEGF. В результате, образование новых сосудов внутри бляшки, происходящих из vasa vasorum, способствует прогрессированию атеросклеротических бляшек, в том числе внутрибляшечному кровоизлиянию, расширению липидного ядра, инфильтрации воспалительных клеток и окончательному разрыву [5]. Под действием атерогенных условий высокий уровень экспрессии HIF-1 в макрофагах способствует формированию пенистых клеток и, следовательно, атерогенезу.

Роль HIF в развитии лёгочной гипертензии.

HIF-1 ингибирует экспрессию потенциал-зависимых калиевых каналов Kv2.1 и Kv1.5 и активирует экспрессию кальциевых каналов гладкомышечных клеток лёгочной артерии [6]. Повышенная концентрация калия и кальция запускает деполяризацию мембраны гладкомышечных клеток и сужение сосуда. Кроме того, HIF-1 способствует экспрессии эндотелина-1 как в гладкомышечных, так и эндотелиальных клетках лёгочной артерии, что ведет к активации рецепторов эндотелина-1 на гладкомышечных клетках и вазоконстрикции. Хроническая гипоксия вызывает экспрессию ангиотензинпревращающего фермента и образование ангиотензина II [1]. Было показано, что синтез ангиотензина II опосредуется экспрессией HIF-1 $\alpha$  [7]. Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что HIF играет первостепенную роль в патогенезе лёгочной гипертензии.

#### **Выводы:**

1 Роль HIF в патогенезе различных заболеваний неоднозначна. В частности, при лёгочной гипертензии и атеросклерозе имеет место повышение уровня экспрессии HIF, что способствует прогрессированию данных заболеваний. При ишемической болезни сердца повышение уровня экспрессии HIF оказывает выраженное протективное действие, снижает выраженность основных клинических проявлений при данном заболевании.

2 Дистантное ишемическое пре- и посткондиционирование эффективны в

плане ограничения размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка при ишемии и реперфузии миокарда у крыс.

3 Дистантное ишемическое прекондиционирование эффективно в плане снижения длительности нарушений сердечного ритма во время 30-минутной ишемии миокарда у крыс.

4 Направленный поиск способов и подходов к изменению уровня экспрессии HIF может иметь важное значение при разработке новых методов лечения таких распространённых заболеваний как ишемическая болезнь сердца и атеросклероз.

*Markuts D.A.*

## **HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR: ROLE IN PATHOGENESIS OF DIFFERENT DISEASES**

*Tutor PhD Yushkevich P. F.*

*Department of pathologic physiology,  
Belarusian State Medical University, Minsk*

### **Литература**

1. Серебровская, Т. В. Гипоксия-индуцибельный фактор: роль в патофизиологии дыхания / Т. В. Серебровская // Український пульмонологічний журнал. – 2005. - № 3. – С. 77-81.
2. Andreka, G. Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs / G. Andreka, M. Vertesaljai, P. Andreka // Heart. – 2007. – Vol. 93, № 6. – P. 749–752.
3. Clark, C. Coronary artery ligation in anesthetized rats as a method for the production of experimental dysrhythmias and for the determination of infarct size / C. Clark // J Pharmacol Methods. – 1980. – Vol. 3, № 4. – P. 357–368.
4. Fishbein, M. C. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyltetrazolium chloride tissue enzyme staining technique / M. C. Fishbein // Am Heart J. – 1981. – Vol. 101, № 5. – P. 593–600.