

DOI: 10.1134/S0869813918110080

**СОЧЕТАНИЕ ГИПЕРКАПНИИ И ГИПОКСИИ
ПРИВОДИТ К АЦИДОЗУ И УВЕЛИЧИВАЕТ СОДЕРЖАНИЕ HIF-1 α
В ГИППОКАМПЕ КРЫС**

© В. П. Куликов,^{1,3} Ю. Г. Мотин,² П. П. Трегуб,^{1,3} П. Д. Ковзелев,¹
К. А. Шошин,¹ Е. К. Зинченко,¹ А. Е. Чернецкий¹

¹ Алтайский медицинский институт последипломного образования,
Барнаул, Россия

E-mail: pfiza_asmu@mail.ru

² Краевая клиническая больница, Барнаул, Россия

³ Красноярский государственный медицинский университет
им. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ России, Красноярск, Россия

Исследовали газы артериальной крови и содержание транскрипционного фактора HIF-1 α в нейронах гиппокампа крыс после ежедневного (на протяжении 7 суток) 30-минутного изолированного и сочетанного респираторного воздействия перmissive гиперкапнии (PCO₂ 50 мм рт. ст.) и умеренной гипоксии (PO₂ 90 мм рт. ст.). Содержание HIF-1 α в гиппокампе увеличивалось после сочетанного, но не изолированного воздействия умеренной гиперкапнии и гипоксии. Создание гипоксии и/или гиперкапнии во вдыхаемом воздухе формировало соответствующий газовый состав артериальной крови. При этом в группе нормобарической гипоксии артериальное напряжение CO₂ было ниже, чем в группе контроля, но оставалось в пределах нормокапнии, а артериальное напряжение кислорода при гиперкапнической гипоксии падало в меньшей степени по сравнению с изолированной гипоксией. Гиперкапния как в изолированном, так и в сочетанном с гипоксией применении сдвигала кислотно-основное состояние в сторону ацидоза.

Ключевые слова: гипоксия, гиперкапния, HIF-1 α , нейропротекция, респираторный ацидоз.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 11. С. 1347—1355. 2018

V. P. Kulikov,^{1,3} Yu. G. Motin,² P. P. Tregub,^{1,3} P. D. Kovzelev,¹ K. A. Shoshin,¹ E. K. Zinchenko,¹ A. E. Chernetsky¹. COMBINED HYPERCAPNIA AND HYPOXIA LEAD TO THE ACIDOSIS AND INCREASE THE AMOUNT HIF-1 α IN RAT HIPPOCAMPUS. ¹ LLC «Altai Medical Institute of Postgraduate Education», Barnaul, Russia, e-mail: pfiza_asmu@mail.ru; ² Regional Clinical Hospital, Barnaul, Russia; Professor V. F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Krasnoyarsk, Russia.

The gas composition of the arterial blood and the HIF-1 α expression in hippocampal neurons of rats were measured after 7-day long daily 30-minute treatment with isolated or combined permissive hypercapnia (PCO₂ = 50 mmHg) and moderate hypoxia (PO₂ = 90 mmHg). HIF-1 α expression was increased in the hippocampus after combined, but not isolated, treatment with mode-

rate hypercapnia and hypoxia. The hypercapnic and/or hypoxic gas composition of the inhaled air defined the corresponding gas composition of the blood. The arterial CO₂ was lower in the normobaric hypoxia group compared to control, while remaining in the normocapnic range. The arterial O₂ in hypercapnic hypoxia was lowered, but not as low as in isolated hypoxia. Hypercapnia, both isolated and in combination with hypoxia, lowered the blood pH and thus led to the acidosis.

Key words: hypoxia, hypercapnia, HIF-1 α , neuroprotection, respiratory acidosis.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 11. P. 1347—1355. 2018

Известно, что гипоксические респираторные тренировки снижают интенсивность гибели нервных клеток в условиях аноксии и ишемии [1, 2]. Также установлено, что перmissive (разрешительная, нетоксичная) гиперкапния стимулирует ишемическую толерантность нейронов [3, 4]. При этом наши данные показывают, что сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии обладает более выраженным нейропротективным эффектом, чем их изолированное применение [5].

Одним из ключевых элементов формирования физиологического эффекта гипоксического воздействия является транскрипционный фактор HIF-1 α [6], накопление которого, по нашим данным, индуцируется в головном мозге не только дефицитом кислорода, но и избытком CO₂ [7]. Причем уровень HIF-1 α в тканях головного мозга крыс после сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии был максимальным по сравнению с их изолированным применением. Эти данные существенно изменяют представления о механизмах стимуляции продукции в организме HIF-1 α . Однако в указанной работе не было исследовано влияние гиперкапнической гипоксии на газовый состав и кислотно-основное состояние артериальной крови. При этом хорошо известно, что экзогенная гиперкапния и гипоксия вызывают адаптивные изменения дыхания и кровообращения, направленные на поддержание газового гомеостаза, а напряжение CO₂ эффективно изменяет концентрацию в крови протонов и кислотно-основное состояние. Кроме того, важно получить данные о содержании HIF-1 α после курсового воздействия дефицита кислорода и избытка углекислоты на участок гиппокампа, наиболее чувствительный к гипоксии [8, 9]. Поэтому задачей настоящей работы стало исследование гиперкапнических/гипоксических воздействий на продукцию HIF-1 α в нервных клетках CA1-региона гиппокампа при изменениях газового состава и кислотно-основного состояния артериальной крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Это исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями биоэтического комитета КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого. Две серии экспериментов были проведены на 60 крысах-самцах линии Вистар массой тела 284.5 \pm 46 г. В первой серии исследовали газовый состав артериальной крови при воздействии гипоксии и/или гиперкапнии. Во второй серии измеряли содержание HIF-1 α в нейронах CA1 региона гиппокампа после курса аналогичных воздействий. Животные каждой серии были рандомизированы в 4 экспериментальные группы, которые подвергались 7 сеансам изолированного и сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии по 20 мин ежедневно. Респираторные воздействия проводили в герметичной камере, как описано ранее [7]. Группы животных различались по газовому составу вдыхаемого воздуха во время тренировочных воздействий следующим образом:

— группа нормобарической гипоксии: $PO_2 = 90$ мм рт. ст.; $PCO_2 = 1$ мм рт. ст.; остальное N_2 ;
— группа пермиссивной гиперкапнии: $PO_2 = 150$ мм рт. ст.; $PCO_2 = 50$ мм рт. ст.; остальное N_2 ;
— группа гиперкапнической гипоксии: $PO_2 = 90$ мм рт. ст.; $PCO_2 = 50$ мм рт. ст.; остальное N_2 ;
— контрольная группа: $PO_2 = 150$ мм рт. ст.; $PCO_2 = 1$ мм рт. ст.; остальное N_2 .

У крыс первой экспериментальной серии на 20-й минуте последнего сеанса респираторного воздействия под наркозом (внутрибрюшинное введение смеси 75 мг кетамина и 10 мг ксилазина на 1 кг массы тела) забирали кровь из брюшной аорты в шприц с гепарином, сбалансированным по электролитам (Radiometer, Дания) для немедленной оценки газового состава крови и pH на анализаторе ABL-5 (Radiometer, Дания).

Животных второй экспериментальной серии на следующие сутки после завершения курса респираторных воздействий декапитировали, после чего проводили забор головного мозга, его заморозку при температуре -35 °C и секционирование (толщина срезов 8 мкм) на криотоме CryoCut 1800 (Leica, Германия). Далее проводили иммуногистохимическое окрашивание срезов для флуоресцентной микроскопии с использованием мышинных моноклональных антител к HIF-1 α (Abcam, кат. Nab8366, Великобритания) и антимышиных козьих антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa Fluor® 555 Conjugate (Signaling Technology, Inc. USA, кат. N4409) в соответствии с протоколами, рекомендуемыми производителями. Полуколичественную оценку интенсивности окраски проводили по 3-балльной шкале (0 баллов — отсутствие окраски, 3 балла — максимально интенсивная окраска) не менее чем в 5 полях зрения при 400-кратном увеличении на флуоресцентном микроскопе Eclipse 50i с видеокамерой DS-Fa1 (Nikon, Япония).

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программного пакета Statistica v6.0. Значимость различий измеряемых параметров оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Все показатели представлены в виде средних величин (Me — медиана), верхнего и нижнего квартиля (25 и 75 %). Достоверными считались различия, для которых уровень p был меньше 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка газового состава артериальной крови у крыс во время респираторных воздействий показала, что уровень pH (рис. 1) в группах, где присутствовал гиперкапнический компонент (ПГ и ГГ), был значимо ниже (около 7.1), по сравнению с группами НГ и контроля (около 7.35). Аналогичные значения pH для интактных крыс и крыс, подвергнутых воздействию «умеренной» гиперкапнии, были продемонстрированы в работе Т. Тао и соавт. [3]. При этом значения pH в группе НГ не показали значимых различий с контрольной группой, что свидетельствует об отсутствии сдвига кислотно-основного состояния при изолированном гипоксическом воздействии.

Напряжение CO_2 в артериальной крови крыс (рис. 2) в группах ПГ и ГГ (91 и 81 мм рт. ст. соответственно) было, как и ожидалось, существенно выше, чем в группе контроля (38 мм рт. ст.). Эти значения соответствовали уровню «умеренной» гиперкапнии (60—100 мм рт. ст.), показавшей максимальный нейропротекторный эффект в работе [3]. При этом различий в значе-

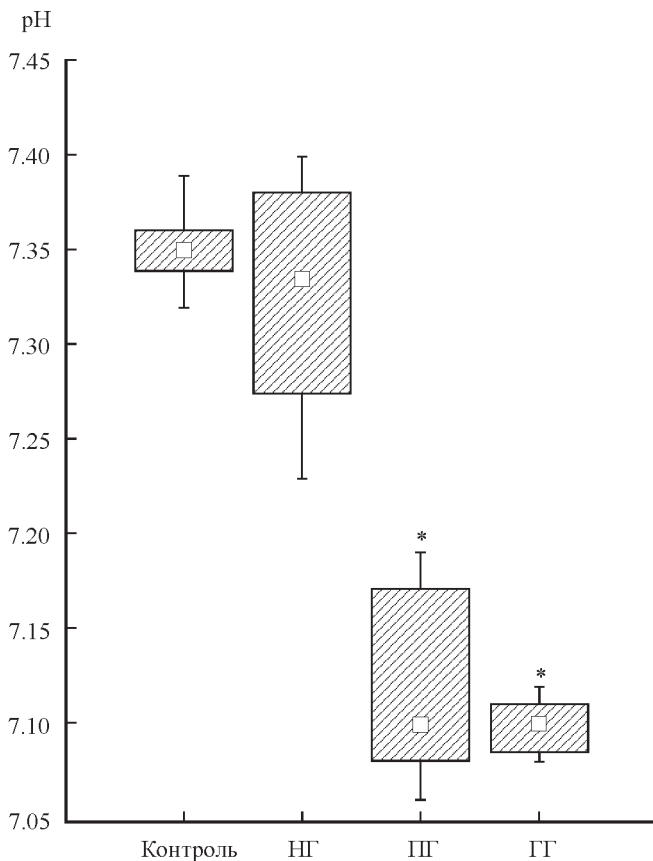


Рис. 1. Значения рН артериальной крови у крыс при изолированном и сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии.

Контроль — контрольная группа ($n = 9$); НГ — нормобарическая гипоксия ($n = 8$); ПГ — перmissive гиперкапния ($n = 9$); ГГ — гиперкапническая гипоксия ($n = 9$). * Различия достоверны по сравнению с группами контроля и ПГ ($p < 0.001$).

нии напряжения CO_2 между группами ПГ и ГГ не наблюдалось. Уровень CO_2 в артериальной крови крыс контрольной группы находился в пределах справочных нормативов и данных других исследователей [3, 4]. В группе НГ PaCO_2 было ниже (30 мм рт. ст.), чем в группе контроля, что, вероятно, обусловлено гипервентиляцией гипоксического генеза. Важно подчеркнуть, что значения PaCO_2 в группе НГ были ниже контроля, но оставались в пределах нормокапнии [10].

Напряжение кислорода в артериальной крови крыс (рис. 3) в группах НГ и ГГ (33 и 48 мм рт. ст. соответственно) было существенно ниже, чем в группах контроля и ПГ (102 и 107 мм рт. ст. соответственно). При этом PaO_2 в крови крыс из группы ГГ было значимо больше по сравнению с группой НГ.

Анализ результатов микроскопии тканей головного мозга из СА1 региона гиппокампа (рис. 4), подготовленных для иммунофлуоресцентного исследования, показал, что после 7-кратного воздействия гиперкапнической гипоксии экспрессия транскрипционного фактора HIF-1 α была максимальной из исследуемых экспериментальных групп (рис. 5). При этом в группах НГ и ПГ не было выявлено различий как по отношению к контролю, так и друг к другу.

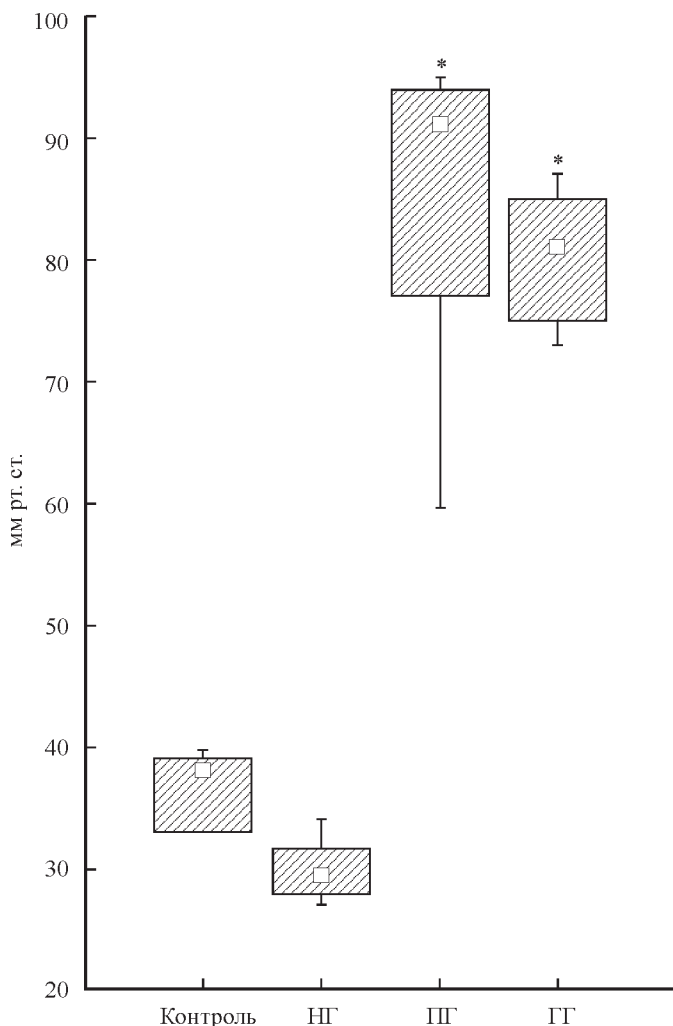


Рис. 2. Напряжение CO_2 в артериальной крови у крыс при изолированном и сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии.

Обозначения те же, что и на рис. 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе представлены результаты иммуногистохимического исследования накопления HIF-1 α в нервных клетках CA1 региона гиппокампа крыс с учетом влияния респираторных гиперкапнически-гипоксических воздействий на газовый состав артериальной крови.

Из данных о газовом и кислотно-щелочном составе крови очевидно, что гиперкапния препятствует снижению парциального напряжения кислорода в артериальной крови. Механизм этого антигипоксического эффекта может быть связан с одновременной стимуляцией CO_2 легочной вентиляции и легочной перфузии. Стимуляция углекислым газом легочной вентиляции хорошо известна и подтверждается в нашем исследовании снижением у крыс

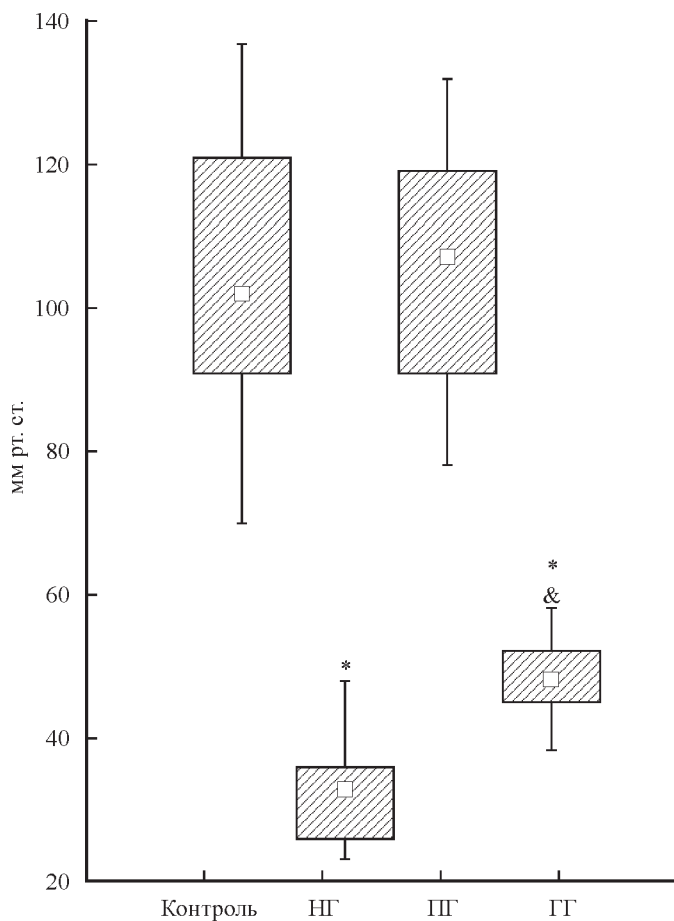


Рис. 3. Парциальное напряжение O₂ в артериальной крови у крыс при изолированном и сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии.

Обозначения те же, что и на рис. 1. & Различия достоверны по сравнению с группой НГ ($p < 0.01$).

PaCO₂ при нормобарической гипоксии. В работе I. C. Chuang и соавт. [11] показано, что стимулирующий эффект на легочную перфузию экзогенной гиперкапнической гипоксии обусловлен CO₂-индуцированной легочной вазодилатацией. Подобную с представленной в нашей работе динамику увеличения парциального давления кислорода в артериальной крови при повышении концентрации CO₂ во вдыхаемом воздухе наблюдали в своем эксперименте Q. Zhao и соавт. [4].

Увеличение содержания транскрипционного фактора HIF-1 α в головном мозге является одним из ключевых нейропротекторных механизмов [6, 12]. При этом нейроны CA1 региона гиппокампа обладают наибольшей чувствительностью к гипоксии, поэтому повышение концентрации HIF-1 α в этой области головного мозга считается характерным признаком формирования ишемической толерантности [13].

Отсутствие значимого прироста HIF-1 α в гиппокампе крыс на изолированные гипоксические и гиперкапнические воздействия, вероятно, связано с умеренным изменением газового состава вдыхаемого воздуха и относительно

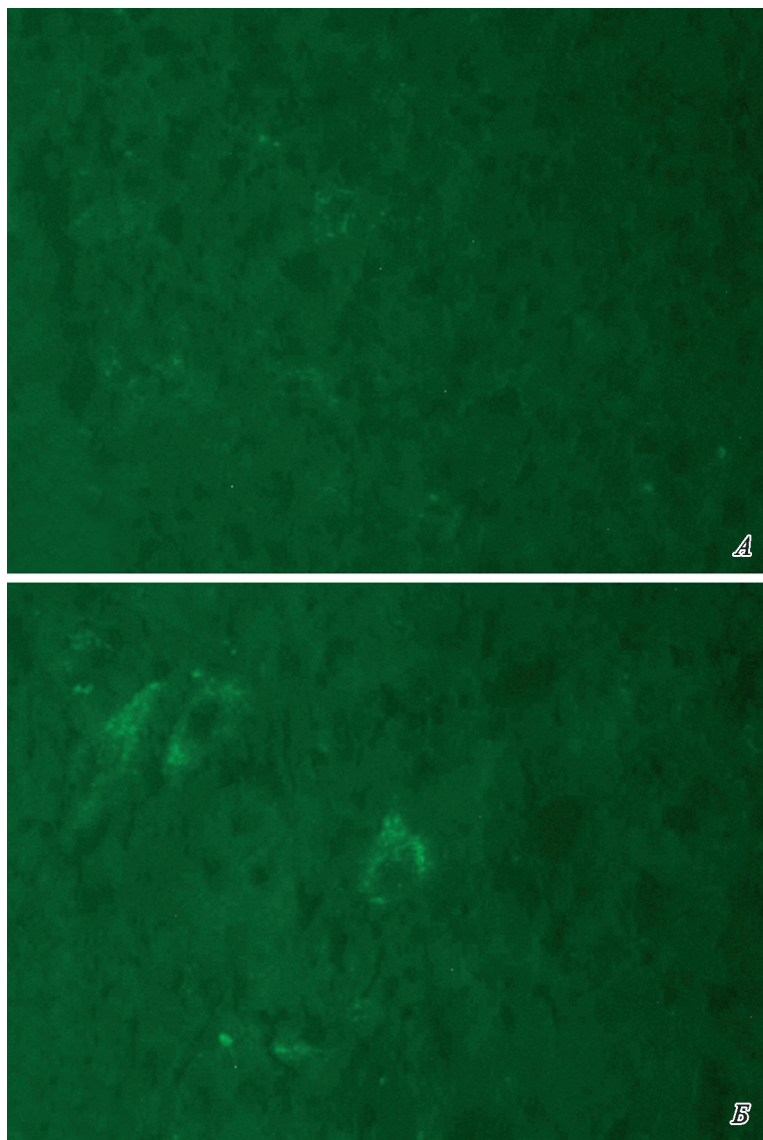


Рис. 4. Накопление HIF-1 α в нейронах CA1 региона гиппокампа, флуоресцентная микроскопия, увеличение $\times 400$.

A — крыса контрольной группы, *B* — крыса из группы гиперкапнической гипоксии.

малым объемом экспериментальной выборки. Однако это подтверждает закономерность максимальной стимуляции HIF-1 α сочетанием гиперкапнии и гипоксии, показанное в нашем предыдущем исследовании [7].

В нашем предыдущем эксперименте было продемонстрировано повышение в головном мозге HIF-1 α не только при воздействии дефицита кислорода, но и при повышении CO₂ в нормоксических условиях [7]. В исследовании J. Хи и соавт. [14] было также показано увеличение концентрации HIF-1 α в головном мозге после введения крысам ацетазоламида, основной механизм действия которого заключается в блокировании карбоангидразы, что вызыва-

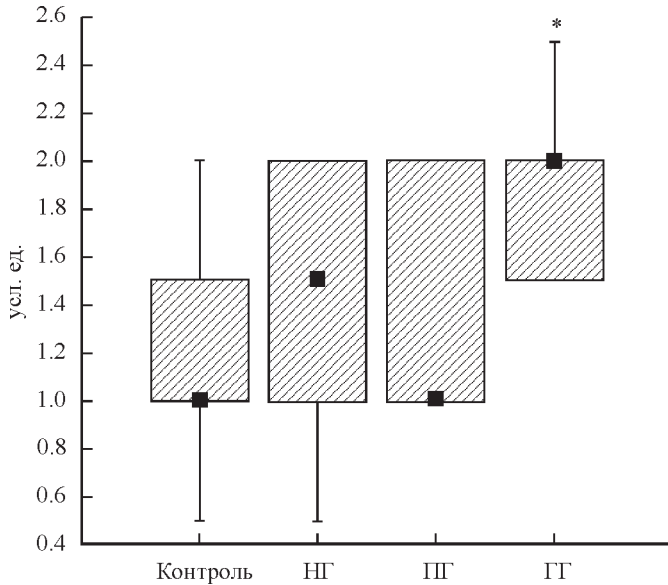


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии HIF-1 α .

Контроль — контрольная группа ($n = 6$); НГ — нормобарическая гипоксия ($n = 6$); ПГ — перmissive гиперкапния ($n = 7$); ГГ — гиперкапническая гипоксия ($n = 6$). * $p < 0.01$ — Различия достоверны по сравнению с контролем ($n = 7$).

ет гиперкапнию и метаболический ацидоз. Поэтому можно полагать, что изолированная гиперкапния самостоятельно влияет на процесс накопления HIF-1 α , а в сочетании с дефицитом кислорода значимо усиливает этот эффект. Механизм этого стимулирующего эффекта гиперкапнии на HIF-1 α не установлен. Он может быть связан как с непосредственным действием углекислоты, так и со сдвигом pH в кислую сторону. Как следует из наших данных, в пользу первого варианта свидетельствует то, что стимуляция HIF-1 α наблюдается при гиперкапнической гипоксии, для которой характерно меньшее по сравнению с изолированной гипоксией снижение PaO₂. В пользу второго варианта могут свидетельствовать данные о снижении в условиях ацидоза функциональной активности гидроксилаз, ответственных за инактивацию HIF-1 α при нормоксии [15].

Курсовое воздействие гиперкапнической гипоксии стимулирует накопление HIF-1 α в гиппокампальных нейронах CA1 региона, что может являться одним из механизмов нейропротекции при гиперкапнически-гипоксических тренировках. Изолированное и сочетанное с гипоксией гиперкапническое воздействие приводит к ацидозу. Напряжение кислорода в артериальной крови при гиперкапнической гипоксии падает в меньшей степени по сравнению с изолированной гипоксией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Neckar J., Papousek E., Novakova O. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischemic preconditioning are not additive. *Basic Res. Cardiol.* 97 : 161—167. 2002.
- [2] Zhan L., Wang T., Li W., Xu Z. C., Sun W., Xu E. Activation of Akt/FoxO signaling pathway contributes to induction of neuroprotection against transient global cerebral ischemia by hypoxic preconditioning in adult rats. *J. Neurochem.* 114 : 897—908. 2010.

[3] Tao T., Liu Y., Zhang J., Xu Y., Li W., Zhao M. Therapeutic hypercapnia improves functional recovery and attenuates injury via antiapoptotic mechanisms in a rat focal cerebral ischemia/reperfusion model. *Brain Res.* 1533 : 52—62. 2013.

[4] Zhou Q., Cao B., Niu L., Cui X., Yu H., Liu J., Li H., Li W. Effects of permissive hypercapnia on transient global cerebral ischemia—reperfusion injury in rats. *Anesthesiology.* 112 : 288—297. 2010.

[5] Tregub P., Kulikov V., Motin Y., Bessalov A., Osipov I. Combined exposure to hypercapnia and hypoxia provides its maximum neuroprotective effect during focal ischemic injury in the brain. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 24 (2) : 381—387. 2015.

[6] Murphy B. J. Regulation of malignant progression by the hypoxia-sensitive transcription factors HIF-1 α and MTF-1. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 139 : 495—507. 2004.

[7] Куликов В. П., Трегуб П. П., Ковзелев П. Д. Гиперкапния — альтернативный гипоксии сигнальный стимул для повышения HIF-1 α и эритропоэтина в головном мозге. Патолог. физиология и эксперим. терапия. 3 : 34—37. 2015. [Kulikov V. P., Tregub P. P., Kovzelev P. D., Dorokhov E. A., Belousov A. A. Hypercapnia-alternative hypoxia signal incentives to increase HIF-1 α and erythropoietin in the brain. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 3 : 34—37. 2015. (In Russ.)].

[8] Zhao Y. D., Cheng S. Y., Ou S., Xiao Z., He W. J., Jian-Cui, Ruan H. Z. Effect of hyperbaric hypoxia on the P2X receptors of pyramidal cells in the immature rat hippocampus CA1 sub-field. *Brain Inj.* 26 (3) : 282—290. 2012.

[9] Zhou A. M., Li W. B., Li Q. J., Liu H. Q., Feng R. F., Zhao H. G. A short cerebral ischemic preconditioning upregulates adenosine receptors in the hippocampal CA1 region of rats. *Neurosci. Res.* 48 : 397—40. 2004.

[10] Fraser D., Jensen D., Wolfe L. A., Hahn P. M., Davies G. A. L. Fetal heart rate response to maternal hypocapnia and hypercapnia in late gestation. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 30 : 312. 2008.

[11] Chuang I. C., Dong H. P., Yang R. C., Wang T. H., Tsai J. H., Yang P. H., Huang M. S. Effect of carbon dioxide on pulmonary vascular tone at various pulmonary arterial pressure levels induced by endothelin-1. *Lung.* 188 : 199—207. 2010.

[12] Кувачева Н. В., Моргун А. В., Хилажева Е. Д., Бойцова Е. Б., Рузаева В. А., Шуваев А. Н., Малиновская Н. А., Пожиленкова Е. А., Салмина А. Б. Особенности пролиферации клеток гематоэнцефалического барьера при подавлении HIF-1 α in vitro. Сибир. мед. обозрение. 2 : 51—56. 2016. [Kuvacheva N. V., Morgun A. V., Khilazheva E. D., Boytsova E. B., Ruzaeva V. A., Shuvaev A. N., Malinovskaya N. A., Pozhilenkova E. A., Salmina A. B. Blood brain barrier cell proliferation under HIF-1 α suppressed activity in vitro. *Siberskoe Med. Obozrenie.* 2 : 51—56. 2016. (In Russ.)].

[13] Zhang Y. B., Wang X., Meister E. A., Gong K. R., Yan S. C., Lu G. W., Ji X. M., Shao G. The effects of CoCl₂ on HIF-1 α protein under experimental conditions of autoprogressive hypoxia using mouse models. *Int. J. Mol. Sci.* 15 (6) : 10 999—11 012. 2014.

[14] Xu J., Peng Z., Li R., Dou T., Xu W., Gu G., Liu Y., Kang Z., Tao H., Zhang J. H., Ostrowski R. P., Lu J., Sun X. Normoxic induction of cerebral HIF-1 α by acetazolamide in rats: Role of acidosis. *Neurosci. Lett.* 451 : 274—278. 2009.

[15] Lando D., Gorman J. J., Whitelaw M. L., Peet D. J. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. *Eur. J. Biochem.* 270 : 781—790. 2003.

Поступила 05.03.2018
После доработки 24.09.2018
Принята к публикации 19.11.2018