

## ЭКСПРЕССИЯ мРНК ЭРИТРОПОЭТИНА В СТВОЛЕ МОЗГА КРЫС ПРИ АДАПТАЦИИ К ИНТЕРВАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

Поступила 08.04.09

Представлены результаты исследования содержания мРНК гликопротеина эритропоэтина в структурах ствола мозга крыс в условиях адаптации к интервальной гипоксии при разном содержании кислорода в гипоксических смесях (12 или 7 % O<sub>2</sub>, двухнедельный курс с пятью ежедневными сеансами). Показано, что содержание мРНК эритропоэтина в стволе мозга в условиях подобной адаптации обнаруживает явную тенденцию к уменьшению после курса умеренных гипоксических воздействий (12 % O<sub>2</sub>) и падает более чем вдвое после более «жесткого» курса (7 % O<sub>2</sub>). Высказано предположение, что уменьшение синтеза данного гликопротеина связано с завершением некоего этапа адаптивного процесса после длительного курса гипоксических тренировок.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** интервальная гипоксия, ствол мозга, эритропоэтин, мРНК.

### ВВЕДЕНИЕ

Адаптация (в широком понимании этого термина) является фундаментальным свойством всех живых организмов, лежащим в основе их успешного выживания. Адаптация к условиям сниженного содержания кислорода во внешней среде (гипоксии) представляет собой одну из важнейших разновидностей адаптационного процесса. Эффективность адаптации данного вида у наземных позвоночных в значительной мере определяется перестройками в системе контроля дыхания и модификациями активности стволовых структур мозга.

Наша предыдущая работа [1] была посвящена выяснению роли глутаматных NMDA-рецепторов нейронов ствола мозга в механизмах адаптации системы контроля дыхания к интервальной гипоксии. Мы показали, что глутаматергические звенья стволовых систем в существенной степени вовлечены в адаптационный процесс в дыхательной системе и этот процесс основывается на пластичности NMDA-рецепторов нейронов системы респираторного контроля в условиях экспозиции к сниженному PO<sub>2</sub>. Другим потенциальным агентом,

способным оказывать существенное влияние на эффективность адаптации системы контроля дыхания к условиям гипоксии, по-видимому, является эритропоэтин (Эпо).

Впервые данный гликопротеин был идентифицирован как гематopoэтический фактор (цитокин), который критически необходим для выживания организма в целом и, в частности, для процесса точной дифференциации [2]. Молекулярная масса Эпо составляет 34 кДа. Выяснилось, что на эмбриональной стадии развития организма Эпо синтезируется в кишечнике; в дальнейшем синтез этого агента преимущественно осуществляют почки. В настоящее время Эпо приписывают роль основного физиологического фактора, регулирующего эритропоэз. Было также установлено, что повышение содержания Эпо способствует усилению снабжения тканей кислородом. Следует, однако, учесть, что поставка O<sub>2</sub> тканям в данном аспекте представляет собой процесс с обратной связью, поскольку интенсивности как продукции Эпо, так и самого эритропоэза являются O<sub>2</sub>-зависимыми.

Как упоминалось выше, ранее считалось, что Эпо синтезируется исключительно в «эмбриональном» кишечнике и во «взрослых» почках. Однако оказалось, что Эпо и рецепторы Эпо (ЭпоР) экспрессируются и в других органах и тканях. В частности, процессы экспрессии Эпо и ЭпоР достаточно интенсивны и в пределах ЦНС (в нейро-

<sup>1</sup> Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

<sup>2</sup> ГУ Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова АМН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: dr\_kolesnikova@ukr.net (Е. Э. Колесникова).

нах, глиоцитах, клетках эндотелия) [3]. Экспрессия Эпо и ЭпоР в процессе развития мозга может существенно изменяться [4–6]. Кроме того, была выявлена способность Эпо к тканеспецифической регуляции многих процессов в пределах ЦНС. В частности, было установлено, что Эпо оказывает выраженное нейропротекторное влияние при ишемических и гипоксических воздействиях на ЦНС, метаболическом, нейротоксическом и эксцитотоксическом стрессе [3]. Одновременно Эпо играет роль существенного координационного фактора в отношении различных физиологических событий в ЦНС, включая ограничение продукции свободных радикалов и глутамата, модуляцию процессов синаптической передачи, индукцию вазодилатации в условиях спазма сосудов, стимуляцию ангиогенеза, ограничение степени апоптоза и выраженности процесса воспаления [3].

К функциям Эпо, не связанным с эритропоезом, относят и участие указанного гликопротеина в функционировании структур ствола мозга, которые осуществляют контроль активности дыхательной системы. Так, действие Эпо считают существенным фактором, влияющим на формирование респираторной реакции на гипоксию [7–9] и адаптацию системы контроля дыхания к данному состоянию [8, 10]. ЭпоР присутствуют в нейронных сетях центрального генератора дыхательного ритма (*central respiratory pattern generator*). В частности, наличие подобных рецепторов выявлено в таких структурах дыхательного центра, как пребетцингеровский комплекс (принципиальная часть гипотетического генератора дыхательного ритма) и ядро одиночного пути, которое получает афферентную импульсацию, исходящую от каротидных глобусов. Кроме того, на трансгенных животных с высоким содержанием Эпо в мозгу была продемонстрирована преимущественно «центральная» природа влияния Эпо на формирование респираторной активности. Этот эффект проявлялся как повышение частоты дыхания при гипоксической стимуляции [8, 9]. Предполагается, что именно Эпо в значительной степени осуществляет модуляцию уровня катехоламинов в катехоламинергических нейронах респираторных структур ствола мозга (в частности, в нейронах респираторной понтинной группы А5). В результате этого изменяются частотная и объемная характеристики респираторной реакции на гипоксию (*hypoxic ventilatory response – HVR*) в условиях как острой гипоксии, так и длительной экспозиции к гипоксической стимуляции [8].

Учитывая все приведенные данные, мы исследовали экспрессию Эпо в стволе мозга крыс, прошедших адаптацию к интервальной гипоксии.

## МЕТОДИКА

Серия исследований, посвященная изучению роли Эпо в механизмах адаптации к гипоксии, была проведена на 15 крысах-самцах линии Вистар массой 350–450 г ( $380 \pm 34$  г). Животных разделили на три группы. Группа 1 была контрольной; крыс группы 2 подвергали двухнедельному курсу интервальных гипоксических тренировок (ИГТ) в проточной камере, в которую подавали газовую смесь, содержащую в себе 12 %  $O_2$  и 88 %  $N_2$  (15 мин гипоксии + 15 мин дыхания атмосферным воздухом, пять раз в день). Животные группы 3 адаптировались к ИГТ при дыхании смесью 7 %  $O_2$  и 93 %  $N_2$  (15 мин гипоксии + 15 мин дыхания атмосферным воздухом, пять раз в день).

По окончании курса ИГТ у экспериментальных животных выделяли ствол мозга; операция производилась под эфирным наркозом. Выделение РНК из ткани ствола осуществлялось согласно стандартному протоколу с использованием набора «Trizol RNA Prep 100» (РФ), содержащего в себе тризол (лизирующий реагент, в состав которого входят денатурирующий агент гаунидин тиоцианат и фенол) и *ExtraGene E* (суспензию смеси ионообменников). Содержание мРНК Эпо в стволе мозга определялось с применением метода обратной транскрипции, для чего использовали наборы «RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit» («Fermentas», Литва), и полимеразно-цепной реакции (ПЦР, PCR), многократно увеличивающей количество фрагментов необходимого гена. Для амплификации применяли пары специфических праймеров к гену Эпо – прямой и обратный (*sense* и *antisense* соответственно), синтезированные фирмой «Fermentas» (Литва). *Sense 5'* имел последовательность CCGTCCCAGATACCAAAGTC – 3', а *antisense – 5'* – TGCAGAAAGTATCCGCTGTC – 3'; размеры амплификата соответствовали 300 п. о. (пар оснований). ПЦР проводили в термоциклере «Applied Biosystems 2700» («PerkinElmer», США).

Амплификация фрагмента гена Эпо состояла из 37 циклов, включающих в себя периоды денатурации (94 °С, 1 мин), «отжига» праймеров (61.5 °С, 50 с) и элонгации (72 °С, 1 мин); последний цикл элонгации длился 7 мин.

Полученные данные о содержании мРНК Эпо в ткани ствола мозга нормировались по актину (мРНК Эпо/актин).

Аmplификация фрагмента гена белка  $\alpha$ -актина (прямой праймер – 5' – AACCCSTAAGGCCAACCGTGAAA – 3'; обратный праймер – 5' – TCATGAGGTAGTCTGTTCAGGTC – 3') включала в себя 37 циклов (денатурация – 94 °C, 1 мин, «отжиг» праймеров – 61.5 °C, 50 с и элонгация – 72 °C, 1 мин); последний цикл элонгации продолжался 7 мин.

Аmplификаты разделяли в агарозном геле (2.0 %) на трис-боратном буфере 0.5XTBE, который содержал в себе бромистый этидий. Визуализация амплификатов после горизонтального электрофореза (160 В на протяжении 40 мин) проводилась с помощью трансиллюминатора «Биоком» (РФ).

Весь период исследований животные содержались на стандартном рационе вивария Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины при стандартном световом режиме (12 ч освещенность/12 ч темнота). Исследования проводились соответственно положениям международных конвенций по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1985), а также согласно положениям Комитета по биоэтике Института физиологии им. А. А. Богомольца.

Числовые данные подвергались стандартной статистической обработке и выражались как среднее арифметическое  $\pm$  ошибка среднего ( $M \pm m$ ). Достоверность различий оценивалась с помощью  $t$ -критерия Стьюдента; достоверными считали межгрупповые различия при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

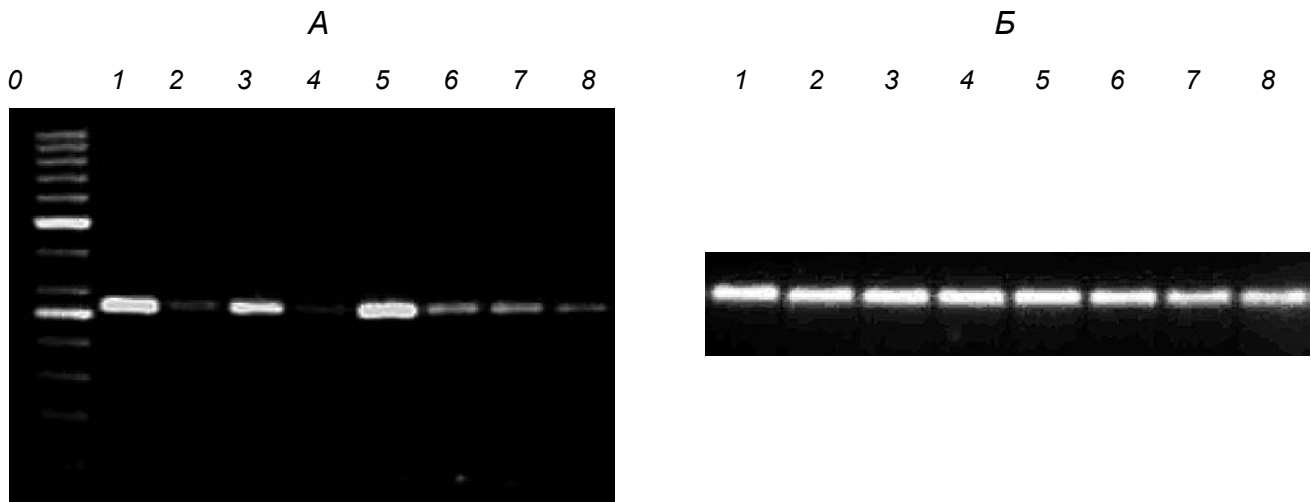
Как упоминалось выше, для выявления роли Эпо в механизмах адаптации дыхательной системы к ИГТ мы оценивали содержание мРНК Эпо в ткани ствола мозга крыс, подвергаемых двухнедельным курсам ИГТ (дыхание гипоксическими смесями со сниженным содержанием  $O_2$ ).

Адаптация к ИГТ при периодических эпизодах дыхания смесью, содержащей в себе 12 %  $O_2$ , сопровождалась выраженной тенденцией к снижению уровня мРНК Эпо в стволе мозга (в среднем на  $28.8 \pm 17.6$  % по сравнению с контролем) (рис. 1; 2). Данное достаточно заметное межгрупповое различие было, тем не менее, недостоверным ( $P > 0.05$ ) из-за значительной индивидуальной

вариабельности полученных значений. Надеюсь получить более четкую картину изменений экспрессии мРНК Эпо в условиях гипоксии, мы провели еще одну серию исследований, в ходе которой крысы адаптировались к ИГТ в более «жестком» гипоксическом режиме: дыхательная смесь содержала в себе всего 7 %  $O_2$ . Оказалось, что адаптация к такой «жесткой» гипоксии (7 %  $O_2$ ) характеризовалась не тенденцией, сходной с изменениями при режиме «12 %  $O_2$ », а драматическим статистически достоверным падением содержания мРНК Эпо в стволе мозга. Среднегрупповой показатель в этом случае был меньше контрольного в среднем на  $62.3 \pm 14.6$  % ( $P < 0.05$ ). Таким образом, можно с уверенностью констатировать, что длительное приспособление к условиям гипоксии в режиме ИГТ в течение двух недель сопровождается существенным уменьшением количества мРНК Эпо в стволовых структурах мозга и, соответственно, подавлением экспрессии данного гликопротеида.

Установлено, что экспрессия Эпо в разных тканях организма значительно различается, что, очевидно, связано с тканеспецифичностью функций этого фактора [3]. В ряде литературных источников [10–12] указывалось, что концентрация мРНК Эпо в тканях мозга при адаптации к хронической гипоксии повышается. Наши же данные, свидетельствующие о снижении уровня мРНК Эпо в стволе мозга в условиях такой адаптации, диаметрально противоположны имеющимся в литературе. Такое противоречие может быть обусловлено (во всяком случае частично) различными сроками экспозиции к гипоксии в разных исследованиях (в различных сообщениях – от нескольких часов до нескольких дней [10–12], т. е. значительно меньшими, чем в нашем случае). Не исключено, что определенную роль играют различия в режиме экспозиции (интервальные воздействия в наших собственных исследованиях и постоянно действующая гипоксия в цитируемых работах).

Причины снижения уровня мРНК Эпо после адаптации к длительной периферической гипоксии могут быть следующими. Показано, что повышение содержания Эпо в мозгу в условиях «мягких» режимов гипоксии либо ишемии может быть фактором, способствующим нейропротекции [13]. Установлено, что Эпо блокирует кальцийзависимое эксцитотоксическое высвобождение глутамата из нервных клеток в случае ишемизации мозга [14]. Таким образом, Эпо препятствует гибели нервных клеток при ишемии, связанной с избыточ-



**Р и с. 1.** Электрофореграмма результатов ПЦР, характеризующая экспрессию мРНК эритропоэтина в стволе мозга крыс при адаптации к интервальной гипоксии (метод обратной транскрипции).

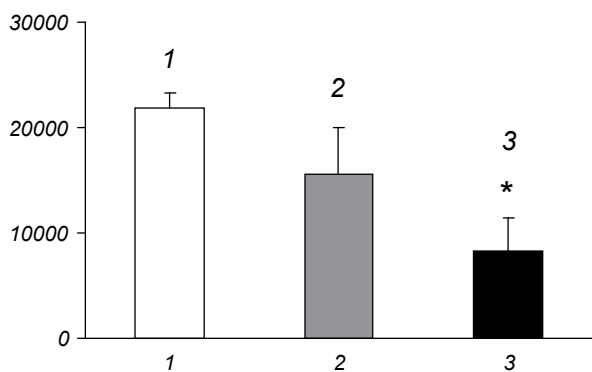
*А* – образец мРНК эритропоэтина, *Б* – актина; *0* – маркер молекулярной массы; *1–3* – контроль; *4–6* – после двухнедельного курса интервальных гипоксических тренировок при содержании в дыхательной смеси 12, 7, 8 – 7 %  $O_2$ .

**Р и с. 1.** Електрофореграма результатів ПЦР, що характеризує експресію мРНК еритропоетину в стовбурі мозку щурів при адаптації до інтервальної гіпоксії (метод зворотної транскрипції).

ным экзоцитозом глутамата и его действием на соответствующие клеточные рецепторы. Поэтому повышение экспрессии Эпо в ткани ствола мозга на ранних стадиях адаптации к условиям сниженного  $pO_2$  в дыхательной среде представляется вполне ожидаемым феноменом. Однако ситуация может оказаться обратной в том случае, когда гипоксиче-

ский фактор действует достаточно длительно и существенные многосторонние адаптационные сдвиги успевают развиться (и даже в ряде аспектов завершиться). Как можно предполагать, снижение уровня мРНК Эпо в стволе мозга после достаточно длительного периода адаптации является свидетельством завершения некоего этапа адаптационного процесса, когда даже умеренные количества Эпо во взаимодействии с другими факторами обеспечивают высокую степень нейропротекции, противодействующей токсическим эффектам избытка глутамата. Следует еще раз подчеркнуть, что описанная в литературе [10–12] динамика содержания Эпо при адаптации к гипоксии существенно отличается по своим временным рамкам от наблюдаемой в процессе курса ИГТ в нашем собственном исследовании.

Сопоставление данных о содержании мРНК Эпо в стволе мозга, полученных в настоящей работе, и количественных характеристик HVR при адаптации к гипоксии [1] (рассматриваемых как несвязанные выборки) позволяет прийти к определенным заключениям. Солиз и соавт. [8] было показано, что у трансгенных мышей Tg6 с повышенным содержанием Эпо в плазме крови и тканях мозга HVR в условиях адаптации к гипоксии характеризуется интенсивностью вентиляции, сходной с таковой у нормальных животных, но специфическим паттерном дыхания: у мышей Tg6 вклад частоты респира-



**Р и с. 2.** Изменения экспрессии мРНК эритропоэтина (Эпо) в стволе мозга крыс при адаптации к интервальной гипоксии.

На диаграмме представлены значения уровня мРНК Эпо, отнесенные к уровню мРНК актина. *1* – контроль; *2, 3* – после адаптации к интервальным гипоксическим тренировкам при содержании в дыхательной смеси 12 и 7 %  $O_2$  соответственно. \* Различие от группы контроля достоверно ( $P < 0.05$ ).

**Р и с. 2.** Зміни експресії мРНК еритропоетину в стовбурі мозку щурів при адаптації до інтервальної гіпоксії.

торных движений в HVR был гораздо бóльшим [8]. После адаптации и другая линия мышей – Tg21 – характеризовалась повышенными по сравнению с таковой у нормальных животных HVR и четырехкратным увеличением содержания Эпо в мозгу [7]. Отличительной особенностью HVR у мышей Tg21 был также прирост интенсивности вентиляции преимущественно за счет частоты дыхательных движений [7]. Поскольку, согласно данным нашего собственного исследования [1], адаптационные перестройки HVR осуществлялись преимущественно за счет глубины дыхания ( $V_T$ ), можно предположить, что синтез Эпо в стволовых структурах мозга заметно снижался ввиду зарегистрированного нами уменьшения содержания мРНК Эпо. По-видимому, пути реализации эффекта Эпо при влиянии ИГТ следует искать в изменениях активности тирозин-гидроксилаза-позитивных клеточных групп (A1C1, A2C2 *medulla oblongata* и A5 и A6 на уровне моста). Эти клетки обладают ЭпоР и вовлекаются в модуляцию функции внешнего дыхания в ходе адаптационного процесса [7].

Вместе с тем, поскольку базисные молекулярные механизмы действия Эпо на ЦНС до сегодняшнего дня выяснены лишь в ограниченной степени, наши изложенные выше предположения требуют дальнейших исследований и верификации в процессе соответствующих экспериментов.

Є. Є. Колесникова<sup>1</sup>, О. Ю. Гарматина<sup>2</sup>, Т. І. Древицька<sup>1</sup>

#### ЕКСПРЕСІЯ мРНК ЕРИТРОПОЕТИНУ В СТОВБУРІ МОЗКУ ЩУРІВ ПРИ АДАПТАЦІЇ ДО ІНТЕРВАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ

<sup>1</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

<sup>2</sup> ДУ Інститут нейрохірургії ім. акад. О. П. Ромоданова АМН України, Київ (Україна).

#### Резюме

Представлені результати дослідження вмісту мРНК глікопротеїну еритропоетину в структурах стовбура мозку щурів в умовах адаптації до інтервальної гіпоксії при різному вмісті кисню в гіпоксичних сумішах (12 або 7 % O<sub>2</sub>, двотижневий курс з п'ятьма щоденними сеансами). Показано, що вміст мРНК еритропоетину в стовбурі мозку в умовах

подібної адаптації демонструє явну тенденцію до зменшення після курсу помірних гіпоксичних дій (12 % O<sub>2</sub>) та падає більш ніж удвічі після більш "жорсткого" курсу (7 % O<sub>2</sub>). Висловлено припущення, що зменшення синтезу даного глікопротеїну пов'язано із завершенням деякого етапу адаптивного процесу після тривалого курсу гіпоксичних тренувань.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Е. Э. Колесникова, В. И. Носарь, И. Н. Маньковская, "Роль глутамата в механизмах адаптации системы контроля дыхания крыс к интервальной гипоксии", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **41**, № 2, 183-191 (2009).
2. W. Jelkmann, "Erythropoietin: structure, control of production, and function," *Physiol. Rev.*, **72**, 449-489 (1992).
3. S. Genc, T. F. Koroglu, and K. Genc, "Erythropoietin and the nervous system," *Brain Res.*, **1000**, 19-31 (2004).
4. S. E. Juul, D. K. Anderson, Y. Li, and R. D. Christensen, "Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system," *Pediat. Res.*, **43**, 40-49 (1998).
5. S. E. Juul, A. Yachnis, A. M. Rojiani, and R. D. Christensen, "Imunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain," *Pediat. Dev. Pathol.*, **2**, 148-158 (1999).
6. S. E. Juul, "Nonerythropoietic roles of erythropoietin in the fetus and neonate," *Clin. Perinatol.*, **27**, 527-541 (2000).
7. J. Soliz, V. Joseph, C. Soulage, et al., "Erythropoietin regulates hypoxic ventilation in mice by interacting with brainstem and carotid bodies," *J. Physiol.*, **568**, Part 2, 559-571 (2005).
8. J. Soliz, C. Soulage, D. M. Hermann, and M. Gassmann, "Acute and chronic exposure to hypoxia alters ventilatory pattern but not minute ventilation of mice overexpressing erythropoietin," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **293**, R1702-R1710 (2007).
9. M. Yalcin, F. Ak, I. T. Cangul, and M. Etruk, "The effect of centrally administered erythropoietin on cardiovascular and respiratory system of anaesthetized rats," *Auton. Neurosci.*, **134**, 1-7 (2007).
10. J. Soliz, M. Gassmann, and V. Joseph, "Soluble erythropoietin receptor is present in the mouse brain and is required for the ventilatory acclimatization to hypoxia," *J. Physiol.*, **583**, Part 1, 329-336 (2007).
11. M. Chikuma, S. Masuda, T. Kobayashi, et al., "Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **279**, E1241-E1248 (2000).
12. H. H. Marti, R. H. Wenger, L. A. Rivas, et al., "Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain," *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 666-676 (1996).
13. H. H. Marti, "Erythropoietin and the hypoxic brain," *J. Exp. Biol.*, **207**, 3233-3242 (2004).
14. M. Kawakami, M. Sekiguchi, K. Sato, et al., "Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia," *J. Biol. Chem.*, **276**, 39469-39475 (2001).