

УДК: 612.084

Любимов Андрей Владимирович,*кандидат медицинских наук***Хохлов Платон Платонович,***кандидат биологических наук,***Шабанов Петр Дмитриевич,***доктор медицинских наук, профессор**отдел нейрофармакологии им. С.В. Аничкова**ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия***Lyubimov Andrey Vladimirovich,***Ph.D. honey. sci., researcher, department of neuropharmacology named after S.V. Anichkov**FGBNU «IEM», St. Petersburg***Khokhlov Platon Platonovich,***cand. biol. sci., senior researcher, department of neuropharmacology named after S.V. Anichkov**FGBNU «IEM», St. Petersburg***Shabanov Pyotr Dmitrievich,***dr. med. sci., professor, department of pharmacology, military medical academy named after s.m.**kirov, ministry of defense of the Russian Federation, St. Petersburg*

УРОВНИ HIF-1A В КРОВИ ДОБРОВОЛЬЦЕВ В УСЛОВИЯХ 100-ДНЕВНОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Аннотация. Целью исследования было оценить содержание HIF1 α в крови здоровых добровольцев-мужчин, рассматриваемой в качестве маркера адаптации к длительному воздействию подпорогового (безвредного) уровня нормобарической гипоксической гипоксии. В специальных стендовых условиях моделировали состояние нормобарической гипоксии в течение 100 дней, меняя состав газовой среды от 20 об.% до 12 об.%. В динамике исследовали клинические показатели крови и уровень HIF1 α методом твердофазного иммуноферментного анализа у 6 добровольцев-испытателей. Клинически значимого эритроцитарного ответа на Длительное воздействие нормобарической гипоксической дыхательной смеси малозначимо меняло эритроцитарный ответ у добровольцев. В период адаптации (первые 30 дней) уровень HIF1 α в крови прогрессивно снижался, затем (с 45 дня) начинал восстанавливаться, и в период 60–100 дней не отличался от исходных значений. HIF1 α в крови может рассматриваться в качестве маркера адаптации к длительному воздействию гипоксии, а также как маркер прекондиционирующего воздействия гипоксии.

Ключевые слова: нормобарическая гипоксия, адаптация, HIF1 α , маркеры прекондиционирования.

ЖҮЗ КҮНДҮК НОРМОБАРДЫК ГИПОКСИЯ ШАРТЫНДА ЫКТЫЯРЧЫЛАРДЫН КАНЫНДАГЫ HIF-1A ДЕНГЭЭЛДЕРИ

Аннотация. Изилдөөнүн максаты нормалдуу гипоксиялык гипоксиянын босогодон ашкан (зыянсыз) деңгээлине узак мөөнөттүү таасир этүүгө ыңгайлашуунун маркери катары эсептелген дени сак эркек ыктыярчылардын канындагы HIF1 α курамын баалоо болгон. Атайын стендик шарттарда газ чөйрөсүнүн курамын 20 көлөм.%дан 12 көлөм%гө чейин өзгөртүү менен нормалдуу гипоксиялык абалдын үлгүсү 100 күн бою түзүлгөн.

Кандын клиникалык параметрлери жана HIF1 α деңгээлинин динамикасын 6 ыктыярчыда ферментке байланышкан имunosorbentтик анализ аркылуу изилденген. Нормобардык гипоксиялык дем алуу аралашмасынын узакка созулган таасири үчүн клиникалык жактан маанилүү эритроциттердин реакциясы ыктыярчыларда эритроциттердин реакциясын олуттуу түрдө өзгөрткөн эмес. Адаптация мезгилинде (биринчи 30 күн) кандагы HIF1 α деңгээли акырындык менен төмөндөп, андан кийин (45-күндөн баштап) калыбына келе баштаган жана 60–100 күн аралыгында баштапкы көрсөткүчтөрдөн айырмаланган эмес. Кандагы HIF1 α гипоксиянын узак мөөнөттүү таасирине ыңгайлашуунун маркери, ошондой эле гипоксиянын алдын ала шарттоочу эффекттеринин маркери катары каралышы мүмкүн.

Негизги сөздөр: нормобардык гипоксия, адаптация, HIF1 α , алдын ала шарттоочу маркерлер.

LEVELS OF HIF1A IN THE BLOOD OF VOLUNTEERS UNDER CONDITIONS OF 100-DAY NORMOBARIC HYPOXIA

Abstract. The aim of the study was to evaluate the content of HIF1 α in the blood of healthy male volunteers, considered as a marker of adaptation to long-term exposure to subthreshold (harmless) levels of normobaric hypoxic hypoxia. Under special bench conditions, the state of normobaric hypoxia was simulated for 100 days, changing the composition of the gaseous medium from 20 vol.% to 12 vol.%. Clinical blood counts and HIF1 α levels were studied in dynamics by enzyme-linked immunosorbent assay in 6 test volunteers. Clinically significant RBC Response to prolonged exposure to a normobaric hypoxic breathing mixture did not significantly change the erythrocyte response in volunteers. During the adaptation period (the first 30 days), the level of HIF1 α in the blood progressively decreased, then (from day 45) it began to recover, and in the period of 60-100 days did not differ from the initial values. HIF1 α in the blood can be considered as a marker of adaptation to long-term exposure to hypoxia, as well as a marker of the preconditioning effects of hypoxia.

Key words: normobaric hypoxia, adaptation, HIF1 α , preconditioning markers.

Введение. Традиционно маркерами гипоксии считаются регуляторы транскрипции индуцируемый гипоксией фактор 1 (HIF1) и индуцируемый гипоксией фактор 2 (HIF2). HIF1 состоит из индуцибельной (реагирующей на изменение концентрации кислорода) субъединицы 1 α (HIF1 α) и конституциональной субъединицы 1 β (HIF1 β). HIF1 α функционирует как общий регулятор, активируемый гипоксией, во всех ядродержащих клетках многоклеточных организмов. Во многих тканях определяется также гомолог субъединицы HIF1 α – HIF2 α , который способен объединяться с HIF1 β , формируя HIF2. В тоже время субъединица HIF2 α , хотя и экспрессируется во многих тканях (мозг, сердце, кишечник, почки, печень, поджелудочная железа) [12] в клетках сосудов и лёгких, особенно в эмбриональный период представлена ограничено [4,10].

Целью исследования было оценить содержание HIF1 α в крови добровольцев, рассматриваемой в качестве маркера адаптации к длительному воздействию подпорогового (безвредного) уровня нормобарической гипоксической гипоксии. Посылками исследования послужили данные, что уровень белка HIF1 α в клетках резко увеличивается при концентрациях O₂ от 6% (соответствует 42 мм рт. ст.) до 0,5% (соответствует 3,5 мм рт. ст.), а при реоксигенации до 20% (140 мм рт. ст.) происходит его быстрый распад с периодом полураспада менее 5 мин [7, 11]. Важным также было сравнить адаптационных реакции человека по показателям характе-

ристики эритроцитов на гипоксическое воздействие с изменениями концентрации HIF1 α [5, 6, 8, 9].

Материалы и методы. Исследования проведены на базе испытательного стенда АО «АСМ» (Санкт-Петербург) с участием 6 мужчин в возрасте 25-30 лет (5 человек) и 51 года (1 человек), годных по состоянию здоровья к выходу в море на подводных лодках и подписавших добровольное информированное согласие на участие в испытаниях. В течение 100 суток непрерывно 6 добровольцев-испытателей находилось в герметичном жилом испытательном комплексе в состоянии нормобарической гипоксической гипоксии.

Проведение испытаний с участием испытателей-добровольцев осуществляли в соответствии с действующими нормами международного права и законодательства РФ, необходимостью обеспечения безопасности жизни и здоровья всех участников испытаний, задачами исследования.

В случае появления различных противопоказаний к дальнейшему участию в исследованиях доброволец от исследований отстранялся и направлялся на обследование в стационар медицинской организации. В случае невозможности по различным причинам поддержания параметров гипоксической газовой среды и микроклимата в помещениях объекта в указанных пределах, испытания должны были быть прекращены, испытатели должны были быть выведены из герметичных помещений.

Таблица 1 – Показатели микроклимата и воздушной среды при пребывании в герметичном жилом стенде

Параметры, ед. изм.	Значение параметров в нормальных условиях
Кислород, об.%	12 – 20
Диоксид углерода, об.%	0,1 – 1,5
Оксид углерода, мг/м ³	0 – 15
Диоксид азота, мг/м ³	0 – 1,5
Сероводород, мг/м ³	0 – 1,5
Аммиак, мг/м ³	0 – 2,4
Ацетон, мг/м ³	0 – 15
Сумма ароматических углеводородов, мг/м ³	0 – 60
Сумма предельных углеводородов, мг/м ³	0 – 105
Температура, °С	18 – 30
Давление, МПа	0,093 – 0,172
Влажность, %	40 – 70
Скорость движения воздуха, м/с	0,1 – 0,3

Основным параметром гипоксической газозвушной среды, имеющим наибольший интерес с точки зрения оценки механизмов адаптации к гипоксическим условиям, является концентрация кислорода. В ходе исследования была обеспечена концентрация кислорода в интервале от 12 до 20 об.%.

При анализе эритроцитарного ответа на воздействие мягкой гипоксии оценивали изменение среднего объема эритроцита MCV (MeanCorpuscularVolume), изменение среднего содержания гемоглобина в одном эритроците MCH (MeanCorpuscularHemoglobin) и средней концентрации гемоглобина в эритроците MCHC (MeanCorpuscularHemoglobinConcentration).

Добровольцы находились под 24-часовым медицинским наблюдением в режиме онлайн.

За несколько дней до начала исследования и в течение всего 100-суточного эксперимента через равные интервалы времени у исследователей проводили отбор крови для оценки динамики концентрации HIF1 α в сыворотке венозной крови с помощью иммуно-ферментного анализа (ИФА). Отбор проб крови испытуемых проводили натошак, в покое, в утреннее время с соблюдением всех правил асептики и антисептики. Для проведения ИФА использовали тест-систему «ELISA» (Cloud-CloneCorp.,

Китай). При определении результатов иммунохимической реакции использовали ридер Synergy 2 (Biotek, США). Статистическую обработку производили с использованием пакетов программ GraphPadPrism (V. 8.2.1) и Statistica (V. 10) с оценкой статистической значимости показателей при $p < 0,05$. Для статистического анализа полученных данных использовали дисперсионный анализ Фридмана (FriedmanANOVA) и критерий согласованности Кендалла (Kendall's concordance) для зависимых переменных с учетом малой выборки. Важно отметить что, являясь непараметрическим, данный анализ не требует соблюдения условий «нормальности» распределения и однородности дисперсий в исследуемых группах. Тем не менее, для контроля типа распределения применяли критерий Шапиро-Уилка, по результатам которого было подтверждено распределение как ненормальное.

Результаты исследования. Клинически значимого эритроцитарного ответа на длительное воздействие нормобарической гипоксической дыхательной смеси, как и ожидали, выявлено не было, хотя при этом были определены статистически значимые колебания средней концентрации гемоглобина в эритроците (MCHC) и абсолютного числа эритроцитов.

При анализе концентрации HIF1 α были получены данные, характеризующие значимый ответ ($p < 0,05$) в изменении концентрации HIF1 α в течение периода наблюдения. Из рисунка 1 видно, что в период адаптации (первые 30 дней) уровень HIF1 α прогрессивно снижается, затем

(с 45 дня) начинает восстанавливаться, и в период 60–100 дней не отличается от исходных значений. Дополнительно был рассчитан коэффициент согласованности Кендалла, равный 0,68, позволяющий предположить существенное различие в динамике концентрации HIF1 α .

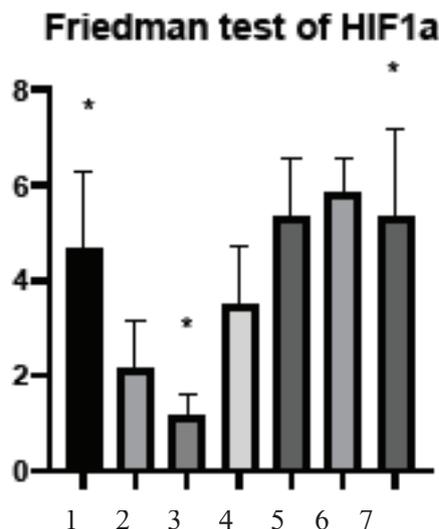


Рисунок 1 – Изменение концентрации HIF1 α в крови мужчин-добровольцев при длительном воздействии нормобарической гипоксической газовой среды

По оси ординат – концентрация HIF1 α в пг/мг белка, по оси абсцисс – число наблюдений. Первый столбик (1) – до начала эксперимента, остальные столбики (2-7) – результаты измерений каждые 15 дней (Ранговый дисперсионный анализ Фридмана и конкордация Кендалла.

Дисперсионный анализ хи-кв ($n = 6$) = 24,42857, $p < 0,00044$; Коэфф. конкордации = 0,67857, Средн. ранг $r = 0,61429$). * $p < 0,05$ к средним величинам HIF1 α .

Сниженная концентрация кислорода в используемой дыхательной среде не оказывала отрицательного влияния на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы. Наблюдали лишь изолированные колебания отдельных параметров в общем и биохимическом анализах крови, не имеющие клинического значения [3].

Обсуждение полученных результатов. В настоящее время в клинической практике на текущий момент не внедрены устойчивые лабораторные или инструментальные индикаторы доклинического гипоксического состояния, указывающего на предпосылки развития патологического процесса. Стандартное обследование, как правило, сосредоточено на поиске уже клинических проявлений процесса. Медикаментозная коррекция в таком случае направлена на восстановление адекватного функционирования органа или системы и не носит профилактического характера.

В проведенном исследовании смоделирована длительная постоянная нормобарическая гипоксическая среда, при этом испытателями-добровольцами осуществлялась интенсивная операторская работа с перерывами на отдых и приём пищи. Непрерывный анализ состояния здоровья испытуемых-добровольцев показал, что клинических проявлений со стороны наиболее остро реагирующей на гипоксию системы – сердечно-сосудистой – зафиксировано не было. Следовательно, длительность исследования определила развитие состояния искусственной гипоксии, а превышение клинического порога значимости не имело отражение в лабораторно-инструментальном обследовании, что свидетельствует о включении в процесс адаптации более тонких механизмов. Колебания лабораторных показателей крови (МСНС и RBC) хоть и были статистически значимы, в целом не имеют клинического значения, поскольку не выходили за рамки референсных

показателей и оценивать их в качестве маркера подпорогового гипоксического состояния с точки зрения практикующего врача возможно лишь с определённой натяжкой.

В то же время, динамическое изменение концентрации HIF1 в периферической крови, особенно в период первичной адаптации (30 дней), можно интерпретировать как значимый молекулярный маркер адаптации к гипоксическим условиям. Несомненно, что изменение концентрации HIF1 в крови стоит отнести к более тонким маркерам гипоксического состояния в сравнении с показателями красной крови. Интерпретация полученных данных требует более детального и комплексного изучения, поскольку HIF1 контролирует не только позитивные, с точки зрения врача-клинициста, явления, но и такие отдаленные последствия, как потенциальный запуск апоптоза и неопластических процессов. Важным с этой точки зрения является изучение отдалённых последствий с целью дифференциальной диагностики адаптивных процессов с патологическими, так как отчётливо определяется вовлечённость именно системных механизмов, а HIF – системный механизм, тонко реагирующий и на острые, и на хронические состояния.

Следует особо подчеркнуть, что определение маркера гипоксического preconditionирования, каковым может рассматриваться уровень HIF1 α в крови, не является самоцелью применения методики preconditionирования. Суть её заключена в запуске адаптивных реакций с формированием биохимического ответа на появление preconditionирующего агента, последствия которого остаются достаточно долго, что и наблюдается в динамике HIF1 α ,

в то время как адаптационные процессы обычно завершаются в течение 2–3 недель. Быстро нормализующиеся показатели энергообмена (АТФ, АДФ, АМФ, энергетический заряд) имеют крайне высокие скорости химических реакций), хотя изменения гликолиза (содержание лактата и пирувата) могут сохраняться достаточно длительно [2], при этом использование их в качестве маркеров гипоксической адаптации, безусловно, затруднительно, поскольку они отражают, как правило, и локальный, и общий текущие процессы.

Отдельного внимания заслуживает вопрос феномена preconditionирования [1]. Патологических явлений при проведённом нами режиме гипоксии не наблюдалось. Первоначальное понижение концентрации HIF1 α с последующей нормализацией его уровня в крови свидетельствует, что система HIF является не единственным, но одним из важных составляющих компонентов адаптации к гипоксии. Выбранный нами относительно щадящий режим нормобарической гипоксии можно использовать в качестве методики экзогенного preconditionирования, хотя он, безусловно, требует доработки, поскольку включает ряд изменяющихся параметров, каковыми следует рассматривать не только снижение концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе, но и замещение его инертным газом, соотношение газов во вдыхаемой смеси, конкретные режимы данных изменений и т. д. С другой стороны, временное повышение концентрации HIF1 α в периферической крови в случае постепенной адаптации может означать и отсутствие негативных последствий в виде запуска механизмов апоптоза.

Список литературы:

1. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. От идеи С.П. Боткина о «предвоздействии» до феномена preconditionирования. Перспективы применения феноменов ишемического и фармакологического preconditionирования // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2016. Т.14, № 1. С. 4–28. [Zarubina IV, Shabanov PD. From the S.P. Botkin's idea of «preexposure» to preconditioning phenomenon. Perspectives for use of phenomena of ischemic and pharmacological preconditioning. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2016;14(1):4-28 (In Russ.)]. doi:10.17816/RCF1414-28.
2. Зарубина И.В., Нурманбетова Ф.Н., Шабанов П.Д. Антигипоксанты при черепно-мозговой травме. Спб.: Элби-СПб, 2006. С. 159. [Zarubina IV, Nurmanbetova FN, Shabanov PD. Antigipoksanty pri cherepno-mozgovoј travme. Spb.: Elbi-SPb; 2006. 159 p.(In Russ.)]
3. Любимов А.В., Иванов А.О., Безкишкий Э.Н. Оценка влияния длительного непрерывного пребывания в искусственной гипоксической газовой среде при нормальном атмосферном давлении на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы человека // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. 2018. Т.16, № 3. С. 47–53. [Lyubimov AV, Ivanov AO, Bezkishkij EN. Assessment of the effect of long-term continuous

stay in the artificial hypoxic gas-air environment at normal atmospheric pressure on the functional state of the cardiovascular system. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2018;16(3):47–53. (In Russ.)] doi: 10.17816/RCF16347-53.

4. *Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, et al.* A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(9): 4273–4278,.doi: 10.1073/pnas.94.9.4273.

5. *Ensrud K, Grimm RH Jr* The white blood cell count and risk for coronary heart disease. *Am Heart J*. 1992;124(1):207–213. doi:10.1016/0002-8703(92)90942-O.

6. *Horne BD, Anderson JL, John JM, et al.* Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(10):1638–1643. doi:10.1016/j.jacc.2005.02.054;

7. *Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH.* Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol Cell Physiol* 1996;271: C1172–C1180. doi: 10.1152/ajpcell.1996.271.4.C1172.

8. *Lee G, Choi S, Kim K, et al.* Association of hemoglobin concentration and its change with cardiovascular and all-cause mortality. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(3): e007723. doi: 10.1161/JAHA.117.007723.

9. *Smith M, Arthur D, Camitta B, et al.* Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1996;14(1):18–24. doi:10.1200/JCO.1996.14.1.18.

10. *Tian H, McKnight SL, Russell DW.* Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*. 2011: 72–82, 1997. doi: 10.1101/gad.11.1.72.

11. *Wang GL, Semenza GL.* Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*.1995;270:1230–1237. doi: 10.1074/jbc.270.3.1230.

12. *Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, et al.* Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J*. 2003;17(2): 271–273. doi: 10.1096/fj.02-0445fje.