УДК 616.152.21-092.9:612.017.2

ВЛИЯНИЕ ПРЕРЫВИСТОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА HIF1A У СПОРТСМЕНОВ С ПОЛИМОРФИЗМОМ PRO582SER

Е.Д. Айзятулова, А.В. Жарков, Н.А. Махова, К.С. Штаев, М.В. Балыкин

HIF1α считается ведущим транскрипционным регулятором генов млекопитающих и является мишенью кислородтранспортных сигнальных путей. Для определения экспрессии гена HIF1α использовали тотальную РНК. Экспрессию гена HIF1α оценивали в начале исследования (контроль), на 1-е, 10-е и 20-е сутки гипоксических воздействий. Показано, экспрессия HIF1A возрастает во всех исследуемых группах и сохраняется повышенной на протяжении до 20 суток гипоксического воздействия. У носителей полиморфизма Pro582Ser уровень экспрессии HIF1A при гипоксии выражен в большей степени, чем у лиц, не имеющих его.

Ключевые слова: гипоксия; HIF1A; генетический полиморфизм Pro582Ser; адаптация; спортсмены.

СПОРТСМЕНДЕРДИН PRO582SER ПОЛИМОРФИЗМИ БАР HIF1A ГЕНИНИН ЭКСПРЕССИЯСЫНА ҮЗГҮЛТҮКТҮҮ НОРМОБАРИКАЛУУ ГИПОКСИЯНЫН ТААСИРИ

HIF1a сүт эмүүчүлөрдүн гендеринин башкы транскрипциондук жөндөгүчү болуп эсептелет жана кычкылтек ташуучу сигналдык жолдордун максаты болуп саналат. HIF1a генинин экспрессиясын аныктоо үчүн жалпы РНК колдонушкан. HIF1a генинин экспрессиясын изилдөөнүн башталышында гипоксия таасиринин 1,10 жана 20-суткасында баалоо жүргүзүшкөн (контроль). HIF1a экспрессиясы бардык изилденген тайпаларда жогорулайт жана 20 суткага чейин сакталат. Pro582Ser полиморфизмин алып жүрүүчүлөрдө HIF1a экспрессиясынын деңгээли гипоксияда жакшыраак билинет

Түйүндүү сөздөр: гипоксия; HIF1a; Pro582Ser генетикалык полиморфизми; адаптация; спортсмендер.

INFLUENCE OF INTERMITTENT NORMOBARIC HYPOXIA ON HIF1A EXPRESSION OF SPORTSMEN WITH PRO582SER POLYMORPHISM

E.D. Aizyatulova, A.V. Zharkov, N.A. Makhova, K.S. Shtayev, M.V. Balykin

HIF1α is considered to be the leading transcription regulator of mammalian genes and is the target of oxygen transport signaling pathways. The total RNA was used to identify the expression of the HIFα gene. The expression of the HIF1α gene was estimated at the beginning of the research (the control), on 1, 10 and 20 days of hypoxic impact. It is shown that expression of HIF1A increases in the all researched groups and remains increased up to 20 days of hypoxic impact. The carriers of the Pro582Ser polymorphism have the level of expression of HIF-1A during hypoxia expressed more than individuals who doesn't have it.

Keywords: hypoxia; HIF1A; Pro582Ser genetical polymorphism; adaptation; sportsmen.

Актуальность. В условиях дефицита O_2 в организме человека развертываются многочисленные компенсаторно-приспособительные реакции в которые вовлечены системные, органные и молекулярно-клеточные механизмы удовлетворения кислородного запроса [1–3]. В настоящее время установлено, что независимо от генеза тканевой гипоксии роль триггера приспособительных реакций играет ген HIF1A, который кодирует субъединицу HIF1α. HIF1α считается ведущим транскрипционным регулятором генов млекопитающих и является мишенью кислородтранспортных сигнальных путей. Являясь транскрипционным фактором, HIF1α обеспечивает экспрессию множества генов, контролирующих синтез эретропоэтина, факторов ангиогенеза, ферментов гликолиза и т. д., обеспечивающих пути компенсации и адаптации при гипоксии [4]. В настоящее время, авторами показано, что существуют отдельные генетические мутации, каким-то образом приводящие к улучшению тех или иных показателей по сравнению с людьми, не имеющими мутаций. К одной из таких мутаций, способствующей наилучшей адаптации к гипоксии относится Pro582Ser в гене HIF1A, наличие

которого предполагает высокую устойчивость клеток к гипоксии и уровень анаэробно-аэробных резервов [5]. Исходя из этого, можно предположить, что наличие полиморфизма может влиять и на экспрессию гена, усиливая или, наоборот, репрессируя ее, тем самым улучшая или ухудшая возможность организма адаптироваться к различным условиям, сопряженным с возникновением гипоксии.

В проведенном исследовании была поставлена задача: определить наличие полиморфизма Pro585Ser гена HIF1α у спортсменов, тренирующихся на выносливость и оценить его экспрессию с учетом полиморфизма при действии прерывистой нормобарической гипоксии.

Задачи:

1. Изучить частоту встречаемости мутации Pro582Ser в гене HIF1α у спортсменов-лыжников и лиц, не занимающихся спортом.
2. Изучить экспрессию гена HIF1α у спортсменов-лыжников и лиц, не занимающихся спортом на 1-е, 10-е и 20-е сутки гипоксических воздействий
3. Оценить влияние наличия полиморфизма Pro582Ser в гене HIF1α на его экспрессию.

Методики исследования. В исследовании приняли участие 2 группы испытуемых. Первую группу составили мужчины (n = 36), в возрасте 18–22 лет, занимающиеся лыжным спортом и имеющие I спортивный разряд, кандидат в мастера спорта и мастер спорта. Вторая группа (контроль) – мужчины в возрасте 18–20 лет (n = 24), регулярно не занимающиеся спортом. Все испытуемые дали добровольное письменное согласие на проведение исследования.

Для выделения ДНК из лейкоцитов использовали набор реактивов “Проба НК” (НПФ “Литех”, Россия). Определение генетического полиморфизма Pro582Ser в гене HIF1A проводили методом полимеразно цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на амплификаторе “CFX96 Touch Real-Time” (ДНК-Технология, Россия) с использованием набора реактивов НПФ “Литех” (Россия). Каждая проба представлена в трех повторах, отрицательный контроль присутствовал в каждой реакции. Термальный профиль реакции включал в себя степень денатурации 5 мин при 95 °С и последующих 45 циклов: денатурации 15 с при 95 °С, отжиг праймеров при 52–57 °С, элонгация 30 с при 72 °С и чтение плашки 10 с.

Для определения экспрессия гена HIF1α использовали тотальную РНК, для получения которой 100 мкл центрифугированных лейкоцитов из венозной крови помещали в лизирующий раствор (“НПФ Литех”, Россия) в течение 10 мин, затем проводили выделение РНК с помощью набора “Проба-НК” (“ДНК-Технология”, Россия) по протоколу производителя. Для разрушения вторичной структуры РНК и эффективного отжига праймеров полученный образец тотальной РНК (10 мкл, 1 мкг/мкл) инкубировали 5 мин при 65 °С в присутствии 25 пкмоль полиТ-праймера с адапторной последовательностью. Затем образец охлаждали и добавляли к 10 мкл реакционной смеси для обратной транскрипции (реактивы “Евроген”, Россия), содержащей 10 ед. активности RiboLock, 200 ед. активности фермента M-MLV-ревертазы, 1 мМ смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов и реакционный буфер для M-MLV-ревертазы (50 мМ Трис-HCl pH 8,3, 50 мМ KCl, 4 мМ MgCl2, 10 мМ DDT). В качестве отрицательного контроля (ОТ.–.) использовали образцы, содержащие вместо M-MLV-ревертазы (обратной транскриптазы) соответствующее количество деионизированной воды. Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе “CFX96 Touch Real-Time” (ДНК-Технология, Россия) при 42 °С в течение 60 мин, после чего смесь инкубировали 10 мин при 70 °С для остановки реакции.

ПЦР-РВ проводили на аппарате “CFX96 Touch Real-Time” (ДНК-Технология, Россия) по следующему протоколу: исходная денатурация матрицы – 3 мин при 95 °С, денатурация 95 °С – 5 мин, отжиг праймеров (в зависимости от температуры), 30 сек; элонгация – 72 °С – 20 сек; чтение плашки – 10 сек. Реакция проходила в течение 50 циклов. За ходом реакции наблюдали с помощью программы “Bio-Rad” (“ДНК-Технология”, Россия).

Экспрессию гена HIF1α оценивали в начале исследования (контроль), на 1-е, 10-е и 20-е сутки гипоксических воздействий. Уровень экспрессии и его изменения оценивали в соответствии с рекомендациями [6].

Гипоксические воздействия моделировались с использованием гипоксикатора “Тибет-4”, Сертификат соответствия № РОСС US. ИМО4.АО4336 от 27 ноября 2003 года, Россия, Новосибирск). Каждая гипоксическая тренировка включала в себя шесть гипоксических циклов (дыхание газовой смесью с 10 % O_2) по 5 минут, которые чередовались с 5-минутными нормоксическими интервалами отдыха. Всего было проведено 20 гипоксических тренировок, которые выполнялись ежедневно шесть раз в неделю.

Все данные были статистически обработаны с использованием пакета математико-статистических программ Statistic ME, 2003.

Результаты исследования и их обсуждение. В соответствии с задачами в исследовании на пер-

вом этапе была изучена частота встречаемости генетического полиморфизма Pro582Ser в гене HIF1α у мужчин контрольной группы, не занимающихся спортом и спортсменов. Результаты исследования показали, что частота встречаемости полиморфизма в группе мужчин, не занимающихся спортом, составляет 25 %, в группе спортсменов-лыжников частота встречаемости этого полиморфизма составляет 62,1 % (таблица 1). Исходя из полученных данных, можно предположить, что уровень спортивной подготовки имеет связь с наличием полиморфизма Pro582Ser в гене HIF1α и можно полагать, связан с физической подготовленностью.

Считается, что ведущим транскрипционным регулятором генов, ответственных за реакцию на недостаток кислорода является HIF1α. Он активируется в физиологически важных местах регуляции кислородных путей, обеспечивая быстрые и адекватные ответы на гипоксический стресс, включает гены, регулирующие процесс ангиогенеза, вазомоторный контроль, энергетический метаболизм, эритропоэз и [7, 8]. При этом имеются сведения, что наличие полиморфизма в аллели Pro582Ser в гене HIF1α может быть ассоциировано с высокой резистентностью организма к условиям гипоксии [7–9].

В соответствии с задачами в последующем исследовании для определения экспрессии гена HIF1α в ответ на гипоксическое воздействие была проведена оценка уровня экспрессии в зависимости от наличия или отсутствия полиморфизма аллели Pro582Ser в гене HIF1α.

Результаты исследования показали, что в состоянии относительного мышечного покоя при дыхании воздухом с содержанием 21 % O_2 экспрессия HIF1α у спортсменов выше, чем у лиц не занимающихся спортом. При этом отмечается, что в группах спортсменов и лиц, не занимающихся спортом, у которых имеется полиморфизм аллели Pro582Ser

Таблица 1 – Распределение мутаций в гене HIF1α у спортсменов в зависимости от спортивного разряда

Спортивная квалификация	HIF1α (полиморфизм Pro/Ser582)
Лица, не занимающиеся спортом	25,0 %
Спортсмены	62,1 %

в гене HIF1α, уровень экспрессии соответствующего гена выше, чем в группах, где полиморфизм гена не обнаружен. Отмечено, что наибольшая экспрессия гена отличается в группе мастеров спорта.

После однократной гипоксической тренировки отмечено, что экспрессия гена HIF1α возрастает во всех группах. При этом наибольшая экспрессия отмечается в группе спортсменов, которая возрастает по сравнению с контролем в 2 раза. В группе лиц, не занимающихся спортом, также наибольший прирост экспрессии отмечается у лиц имеющих полиморфизм Pro582Ser. Подобные изменения свидетельствуют о способности адаптации организма к гипоксии лиц, имеющих полиморфизм в гене HIF1α.

Результаты исследования показали, что на 10-е сутки ежедневных гипоксических тренировок увеличение экспрессии HIF1α сохраняется во всех группах (таблица 2), однако при этом уровень экспрессии по сравнению с первыми сутками увеличивается менее значительно.

Повторное определение экспрессии HIF1α было проведено у спортсменов всех групп и лиц, не занимающихся спортом, на 20-е сутки гипоксических тренировок. Результаты исследования показали: на 20-е сутки гипоксических тренировок уровень HIF1α в спортсменов достоверным образом не изменился по сравнению с 10-ми сутками, хотя и оставался достоверно высоким

Таблица 2 – Экспрессия HIF1α на различных этапах адаптации к гипоксии

Спортивная квалификация	Наличие или отсутствие мутации Pro582Ser в гене HIF1α	Экспрессия гена HIF1α (у. е.)			
		контроль	1-е сутки	10-е сутки	20-е сутки
Спортсмены	Да (20)	0,54 ± 0,002*	1,094 ± 0,002*#	1,23 ± 0,02*#	1,31 ± 0,02*#
	Нет (16)	0,37 ± 0,03	0,71 ± 0,028#	1,20 ± 0,02#	1,53 ± 0,01#
Контроль	Да (4)	0,45 ± 0,004	0,85 ± 0,02*#	1,05 ± 0,02*#	1,15 ± 0,02*#
	Нет (20)	0,33 ± 0,002	0,51 ± 0,04	0,45 ± 0,04	0,95 ± 0,03#

Примечание. * – Различия достоверны по сравнению с группами по наличию полиморфизма при $p \leq 0,05$; # – различия достоверны по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

по сравнению с контролем. Подобные изменения могут свидетельствовать о снижении резистентности организма к гипоксическим воздействиям и могут отражать завершение периода адаптации. В группе лиц, не имеющих полиморфизма Pro582Ser в гене HIF1α, и лиц, не занимающихся спортом, экспрессия HIF1α продолжает достоверно расти по сравнению с 10-ми сутками, так и по сравнению с контролем (см. таблицу 2). Можно предположить, что подобные изменения могут быть связаны с адаптацией к гипоксии у лиц, имеющих полиморфизм Pro582Ser в гене HIF1α, и происходит быстрее.

Выводы

1. У спортсменов-лыжников частота встречаемости полиморфизма Pro582Ser в гене HIF1A составляет 62,1 %; в группе регулярно не занимающиеся спортом – 25 %.
2. Показано, экспрессия HIF1A возрастает во всех исследуемых группах и сохраняется повышенной на протяжении до 20-х суток гипоксического воздействия
3. У носителей полиморфизма Pro582Ser уровень экспрессии HIF1A при гипоксии выражен в большей степени, чем у лиц, не имеющих его.

Литература

1. *Айзятулова Е.Д.* Экспрессия HIF1A у лиц с полиморфизмом Pro582Ser при нормобарической гипоксии / Е.Д. Айзятулова, А.В. Жарков, М.В. Балыкин // Ульяновский медико-биологический журнал. Приложение. Материалы XIII Всероссийской школы-семинара с международным участием “Вопросы экспериментальной и клинической физиологии дыхания” (Санкт-Петербург, 24–28 октября 2016 г.). 2016. № 4. С. 9–10.
2. *Балыкин М.В.* Влияние прерывистой гипобарической гипоксии на экспрессию HIF1A и морфофункциональные изменения в миокарде / М.В. Балыкин, С.А. Сагидова, А.В. Жарков и др. // Ульяновский медико-биологический журнал. 2017. № 2. С. 124–134.
3. *Лукьянова Л.Д.* Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роли в системной регуляции / Л.Д. Лукьянова, Ю.И. Кирова, Г.В. Сукоян // Патогенез. 2011. Т. 9. № 3. С. 4–14.
4. *Larissa A., Shimoda, Steven S. Laurie*. HIF and pulmonary vascular responses to hypoxia // Journal of Applied Physiology. April 2014. Vol. 116. № 7. P. 867–874.
5. *Ахметов И.И.* Влияние полиморфизма гена HIF1A на мышечную деятельность человека / И.И. Ахметов, А.М. Хакимуллина, Е.В. Лобачева и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. Т. 146. № 9. С. 327–329.
6. *Епифанцев А.Т.* Идентификация и исследование экспрессии генов / А.Т. Епифанцев, В.Н. Попов, Д.Н. Федорин. Воронеж: Изд.-полиграф. центр Воронежского гос. ун-та, 2008. 64 с.
7. *Серебровская Т.В.* Новая стратегия в лечении болезней – гипоксия-индуцируемый фактор / Т.В. Серебровская // Вестник Международной академии наук (русская секция). 2006. № 1. С. 29–31.
8. *Simon M.S.* Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF *α* stabilization // Adv. Exp. Med. Biol. 2006. P. 165–170.
9. *Schoenfelder M.* Genetics-based performance talent research: polymorphism as predictors of endurance performance // Journal of Applied Physiology. 2010. Vol. 108. P. 1454–1455.