

© Коллектив авторов, 2018
УДК 611.813.3.018:612.272.2:599.323.4

О. В. Ветровой^{1, 2}, Т. С. Глущенко¹, К. В. Сариева¹, Е. И. Тюлькова¹, Е. А. Рыбникова¹

ИЗМЕНЕНИЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНА H3 В ГИППОКАМПЕ КРЫС ВСЛЕДСТВИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛОЙ ГИПОКСИИ И РОЛЬ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

¹ Лаборатория регуляции функций нейронов мозга (зав. — д-р биол. наук Е. А. Рыбникова),
ФГБУН «Институт физиологии им. И. П. Павлова» РАН; ² кафедра биохимии (зав. — канд. биол. наук В. Е. Стефанов),
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Цель — изучение влияния тяжелой гипобарической гипоксии с последующими сеансами умеренной гипобарической гипоксии в режиме посткондиционирования (ПостК), обладающими нейропротективным свойством, на уровень ацетилирования гистона H3 в нейронах гиппокампа крыс.

Материал и методы. С применением количественного иммуноцитохимического метода исследовано общее ацетилирование гистонов и ацетилирование гистона H3 по лизину 9 (acH3K9), влияющего на конформационные свойства хроматина и экспрессию генов, в пирамидном слое нейронов CA1 поля гиппокампа крыс (n=84) в ответ на различные режимы гипоксических воздействий.

Результаты. Тяжелая повреждающая гипоксия в течение 4 сут не приводит к существенным изменениям уровня ацетилирования acH3K9. Умеренная гипобарической гипоксия в режиме ПостК уже через 1 сут после первого сеанса индуцировала существенное увеличение уровня acH3K9, обеспечивая инициацию адаптивных процессов, вызываемых ПостК.

Выводы. Процесс ацетилирования гистонов, в частности, ацетилирования гистона H3, играет важную роль в обеспечении нейропротективного эффекта гипоксического ПостК.

Ключевые слова: гиппокамп, ацетилирование гистонов, тяжелая гипоксия, гипоксическое посткондиционирование, крыса

В последние десятилетия в мире интенсивно проводится изучение механизмов повышения толерантности мозга к повреждающим факторам (прежде всего, к гипоксии/ишемии), а также осуществляется поиск немедикаментозных способов ее обеспечения, в частности, с использованием прекодиционирующих гипоксических/ишемических воздействий [5]. Влияние умеренной гипоксии или ишемии способствует активации адаптивных, приобретенных эволюционно и генетически детерминированных эндогенных механизмов, направленных на предотвращение структурно-функциональных повреждений мозга, вызываемых тяжелыми, в том числе летальными, формами гипоксии/ишемии [3]. В последние годы обнаружен также протективный эффект посткондиционирующих воздействий, предъявляемых вслед за эпизодами тяжелой ишемии мозга или психоэмоционального и травматического стресса [6, 13]. Убедительно показано, что трехкратная умеренная гипобарическая гипоксия в режиме посткондиционирования нивелирует нарушения

функций мозга, вызываемые тяжелыми гипоксическими воздействиями [13].

Многочисленные исследования показали, что в основе нарушений поведения и способности к обучению при действии тяжелой гипоксии/ишемии лежат изменения функционирования мозга на молекулярно-клеточном уровне. В последние годы обнаружено вовлечение эпигенетической регуляции в обеспечение реакций клеток мозга на гипоксию [7–9, 11, 12]. Однако до сих пор не проводились исследования влияния адаптивной умеренной гипобарической гипоксии в режиме посткондиционирования на модификации эпигенетического статуса в ответ на тяжелые повреждающие воздействия.

В настоящей работе с применением иммуноцитохимических методов проведено изучение влияния тяжелой гипобарической гипоксии и посткондиционирования, эффективно повышающего устойчивость мозга, на модификацию эпигенетических факторов, а именно ацетилирование гистонов H3 по лизину 9.

Сведения об авторах:

Глущенко Татьяна Сергеевна, Сариева Ксения Владимировна, Тюлькова Екатерина Иосифовна, Рыбникова Елена Александровна, лаборатория регуляции функций нейронов мозга, ФГБУН «Институт физиологии им. И. П. Павлова» РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

Ветровой Олег Васильевич (e-mail: vov210292@yandex.ru), ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

Материал и методы. Работа проведена на животных из ЦКП Биокolleкция ИФ РАН, поддержана Программой ФАНО России по сохранению и развитию биоресурсных коллекций. Эксперименты выполняли на самцах крыс линии Вистар ($n=84$) в возрасте 80–90 дней с массой тела 230–260 г. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными ФГБУН «Институт физиологии им. И. П. Павлова» РАН.

Для создания условий тяжелой повреждающей гипоксии (ТГ) крыс помещали в барокамеру проточного типа при температуре от 20 до 25 °C и ступенчато понижали давление до 180 мм рт. ст. (5% O_2 , продолжительность воздействия — 3 ч). Смертность животных в барокамере составляла 50% [4]. Посткондиционирование (ПостК) осуществляли путем одно-, двух- или трехкратного 2-часового воздействия умеренной гипобарической гипоксии (УГГ) (давление в барокамере 360 мм рт. ст., 10% O_2). Воздействие УГГ осуществляли через 24 ч после ТГ с суточными интервалами между сеансами. В течение всего периода проведения экспериментов крысы содержались при режиме свет 12 ч/темнота 12 ч, температуре 20–23 °C и при постоянном доступе к воде и пище.

Декапитацию животных проводили через 2, 3 и 4 сут после ТГ и, соответственно, через 1 сут после одного, двух или трех сеансов УГГ, предъявляемых через 24 ч после воздействия ТГ (ТГ+1, 2 или 3ПостК+1 день). Параллельно осуществляли выведение из эксперимента декапитацией крыс контрольной группы. Число крыс для каждой группы составило 6 особей. После декапитации вскрывали череп, извлекали мозг, отрезали мозжечок и помещали мозг в фиксирующий раствор. Образцы ткани мозга обрабатывали согласно стандартному гистологическому протоколу: фиксировали в молекулярном фиксаторе FineFix (Milestone, Италия) в разведении 28 мл фиксатора+72 мл 96 ° этанола в течение 24 ч при $t=4$ °C. Затем образцы обезжизивали в этаноле возрастающих концентраций, оставляли в бутаноле, проводили через 2 порции ксилола (по 30–40 мин) и заливали в парафин. На ротационном микротоме (Reichert, Австрия) изготавливали серийные срезы мозга во фронтальной плоскости толщиной 7 мкм. Полученные срезы монтировали на предметные стекла, обработанные полилизинном, депарафинизировали в ксилоле (2 смены по 5 мин) и подвергали регидратации в спиртах понижающихся концентраций. Для оценки степени ацетилирования гистона H3 по Lys9 (acH3K9) и определения общего ацетилирования (pan-acetyl, ПА) использовали иммуногистохимическую методику. Основные этапы метода: 1) инкубация с поликлональными кроличьими антителами к acH3K9 (SAB4500347, Sigma Ald., США, разведение в PBS 1:200) или pan-acetyl [(C4)-R: sc-8663-R, Santa Cruz Biotechnology, Inc., США, разведение в PBS 1:500]; 2) инкубация с вторичными противокроличьими биотинилированными антителами (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Inc., США, разведение в PBS 1:200); 3) инкубация с комплексом авидина и биотинилированной пероксидазы (ABC, Vector Laboratories, Inc., США, разведение реагентов А и В 1:100); 4) визуализация реакции с помощью диаминобензидинового кита [DAB substrate kit for peroxidase, Vector Laboratories, Inc., США, буфер (1 капля), 3,3-диаминобензидин (2 капли), H_2O_2 (1 капля) на 2,5 мл H_2O].

Анализ препаратов проводили с помощью морфометрической установки, состоящей из светового микроскопа Jenaval

(Carl Zeiss, Германия), цифровой камеры Baumer CX05c (Baumer Optronics, Германия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением ВидеоТест Мастер Морфология (ВидеоТест, Россия). Подсчитывали нейроны пирамидного слоя CA1 поля гиппокампа в поле зрения площадью 460×340 мкм (об. 40). На основании оценки оптической плотности иммунопозитивные клетки разделяли на 2 класса: слабо и интенсивно окрашенные, анализировали общее число иммунопозитивных и число интенсивно окрашенных клеток. Для каждого животного анализировали по 4 гистологических среза, усредняя значения для каждой области мозга с одного поля зрения конкретной области мозга на срезе. Результаты обрабатывали с помощью пакетов анализа данных Statistica 7.0 Stat Soft Inc. и Microsoft Excel 2003. О значимости различий судили по непараметрическому критерию Манна—Уитни (Mann—Whitney U-test). Изменения считали значимыми при $p \leq 0,05$. Все результаты представлены в виде среднего арифметического значения изучаемого параметра, выраженного в процентах от контроля, и его стандартной ошибки.

Результаты исследования. В работе оценивали общий статус ацетилирования клеток гиппокампа по анализу уровня иммунопозитивности к ПА, позволяющему выявить все имеющиеся в клеточных белках ацетилированные остатки лизина. На *рис. 1* представлены репрезентативные микрофотографии иммунопозитивных к ПА клеток в поле CA1 гиппокампа контрольных крыс и крыс, подвергавшихся воздействию ТГ без или с последующим предъявлением одно-, двух- или трехкратной УГГ в режиме ПостК.

При подсчете иммунопозитивных к этому показателю клеток в CA1 поле гиппокампа крыс, переживших воздействие ТГ, значимых различий по сравнению с контролем не выявлено ни по общему числу (*рис. 2, а*), ни по числу интенсивно окрашенных клеток в течение всего исследованного срока (см. *рис. 2, б*).

Предъявление сеансов ПостК вслед за ТГ приводило к стойкому увеличению как общего числа иммунопозитивных к ПА клеток (до 122% по отношению к контролю), так и интенсивно окрашенных клеток, уже после первого предъявления УГГ. Эффект сохранялся после последующих сеансов УГГ (см. *рис. 2, а, б*).

Наряду с этим, были выявлены особенности содержания одной из наиболее распространенных эпигенетических модификаций — ацетилированного по лизину 9 гистона H3 (acH3K9) в клетках CA1 поля гиппокампа взрослых крыс после воздействия ТГ и ТГ с последующими сеансами УГГ (*рис. 3*).

Тяжелая гипоксия не приводила к достоверному снижению общего числа иммунопозитивных клеток к acH3K9 в области CA1 гиппокампа (*рис. 4, а*). При этом количество интенсивно окрашенных клеток было незначительно снижено

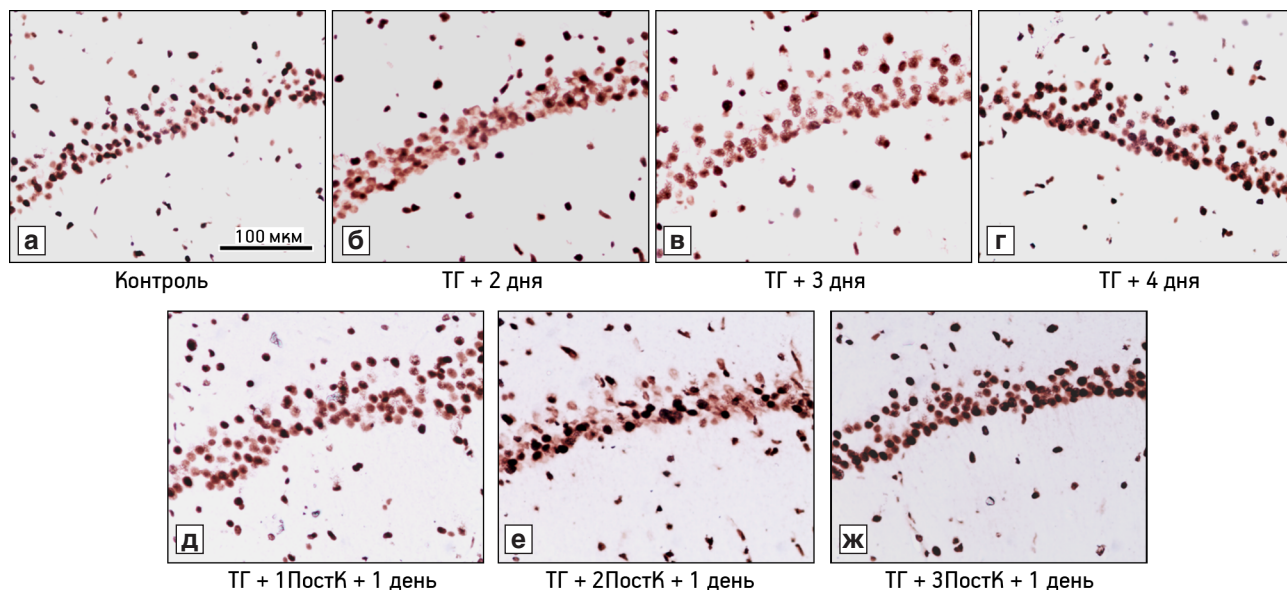


Рис. 1. Микрофотографии области СА1 поля гиппокампа контрольных крыс (а), гиппокампа крыс через 2, 3 и 4 сут после тяжелой гипоксии (ТГ) (б, в, г соответственно) и через день после тяжелой гипоксии в сочетании с одно- (д), двух- (е) и трехкратным (ж) посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксии (ПостК).

Иммуногистохимическая реакция на общее ацетилирование

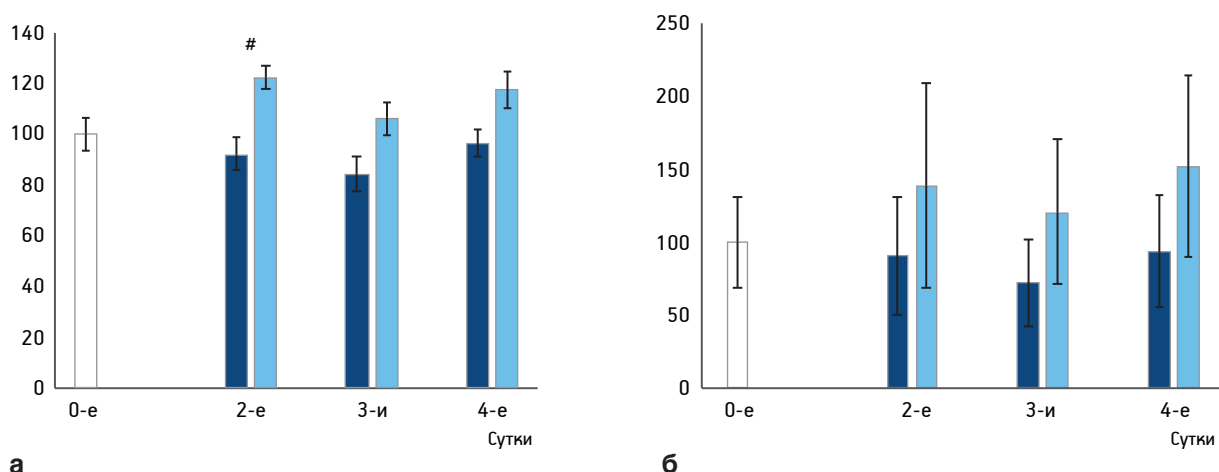


Рис. 2. Общее количество иммунопозитивных (а) и количество интенсивно окрашенных при общем ацетилировании клеток (б) в области СА1 поля гиппокампа контрольных крыс (белые столбики), гиппокампа крыс через 2, 3 и 4 сут после тяжелой гипоксии (темные столбики) и через 1 сут после тяжелой гипоксии в сочетании с одно-, двух- и трехкратным посткондиционированием в условиях умеренной гипобарической гипоксии (светлые столбики).

Здесь и рис. 4: по оси абсцисс — сутки после тяжелого гипоксического воздействия; по оси ординат — изменения количества иммунопозитивных клеток (а) и количества интенсивно окрашенных клеток (б), выраженные в % от контроля. [#] Значимые различия с группой крыс с тяжелой гипоксией ($p \leq 0,05$)

(до 20%) в течение всего исследованного срока (см. рис. 4, б).

Применение УТГ разной кратности вслед за ТГ вызывало увеличение как общего количества иммунопозитивных к асНЗК9 (на 22–30% от контроля), так и в значительной степени интенсивно окрашенных клеток (на 250–280%) уже после первого сеанса ПостК. Такая стимуляция ацетилирования сохранялась по крайней мере в течение 4 сут после ТГ.

Обсуждение полученных данных. В проведенном исследовании выявлены особенности влияния ТГ и ее сочетанного действия с умеренной гипобарической гипоксией в режиме УТГ ПостК на ацетилирование гистона НЗ по лизину 9 в нейронах СА1 поля гиппокампа. Обнаружено, что ТГ на протяжении 4 сут после воздействия не приводит к значимому изменению уровня асНЗК9. Его повышение у УТГ ПостК животных уже после первого сеанса согласуется с опи-

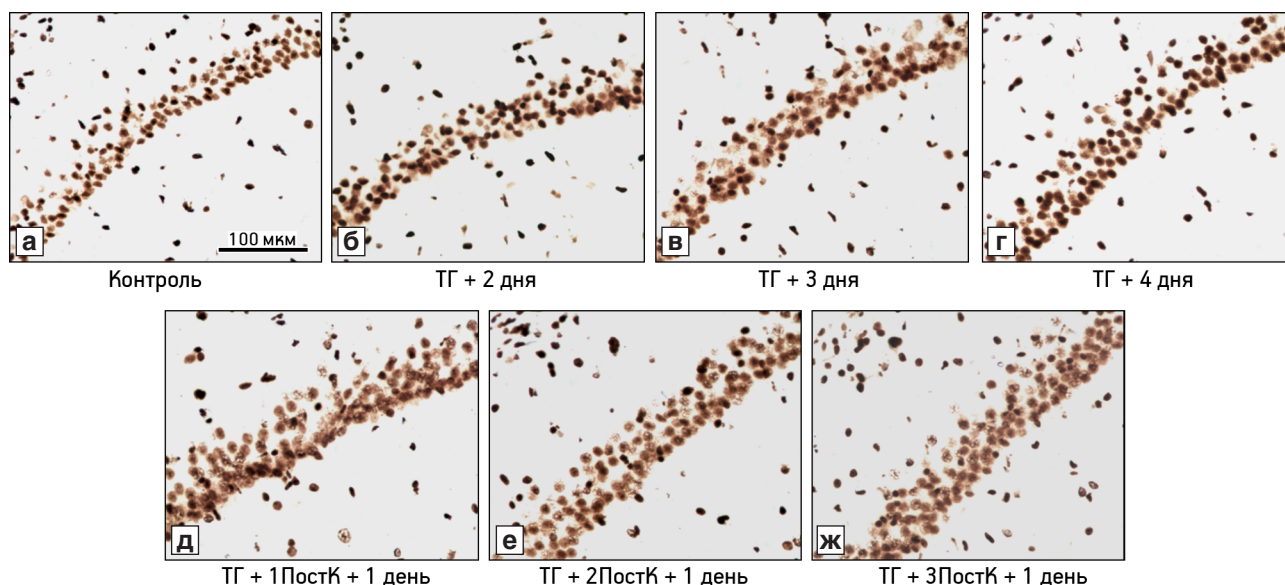


Рис. 3. Микрофотографии области CA1 поля гиппокампа контрольных крыс (а), гиппокампа крыс через 2, 3 и 4 сут после тяжелой гипоксии (ТГ) (б, в, г соответственно) и через 1 сут после тяжелой гипоксии в сочетании с одно- (д), двух- (е) и трехкратным (ж) посткондиционированием в условиях умеренной гипобарической гипоксии. Иммуногистохимическая реакция на ацетилирование гистона H3 по лизину 9

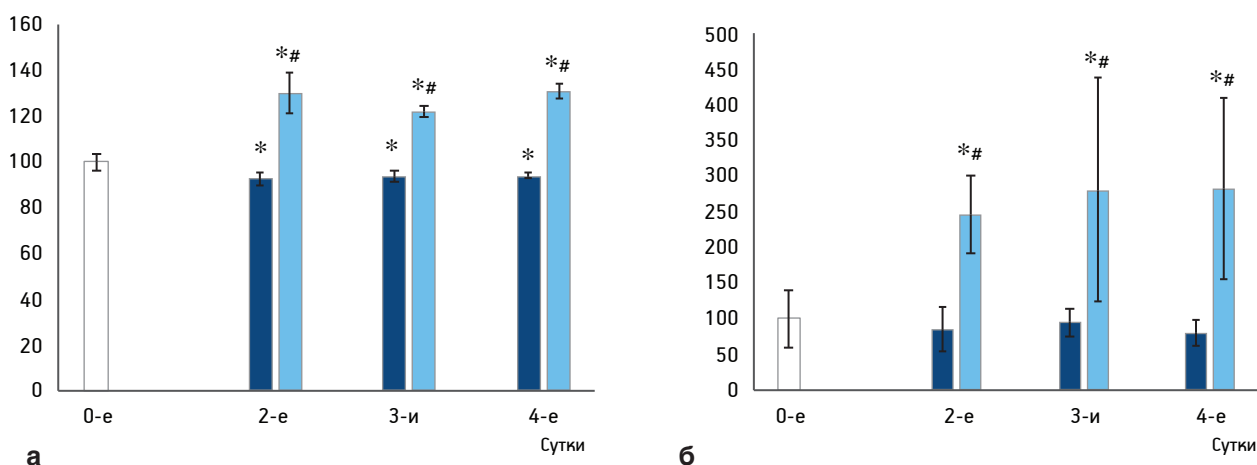


Рис. 4. Общее количество иммунопозитивных (а) и интенсивно окрашенных при ацетилировании гистона H3 по лизину 9 клеток (б) в области CA1 поля гиппокампа контрольных крыс (белые столбики), гиппокампа крыс через 2, 3 и 4 сут после тяжелой гипоксии (темные столбики) и через день после тяжелой гипоксии в сочетании с одно-, двух- и трехкратным посткондиционированием умеренной гипобарической гипоксией (светлые столбики)

санными нами ранее данными о достаточности даже одного сеанса УГГ ПостК для предотвращения процессов клеточной гибели, вызванных ТГ [13]. Сходная тенденция выявлена относительно изменений общего уровня ацетилирования ядерных белков в CA1 поля гиппокампа после воздействия ТГ и ТГ в сочетании с ПостК. Однако увеличение количества интенсивно окрашенных клеток к асНЗК9 после предъявления умеренной гипоксии в режиме посткондиционирования выражено в большей степени, чем к ПА, что, очевидно, свидетельствует о преобладающем вкладе

именно этой модификации в механизмы УГГ ПостК.

Ранее в наших исследованиях было обнаружено снижение экспрессии ряда белков и соответствующих генов через 24 ч после действия ТГ, которое коррелировало с изменениями количества иммунопозитивных клеток к ацетилированию гистона H3 по Lys24 (асНЗК24) в гиппокампе и неокортексе крыс [10]. Различия в изменениях ацетилирования гистона H3 по лизину 9 или 24 можно объяснить специфичностью функций разных форм ацетилирования H3 в реакциях на повреждающие воздействия.

Несмотря на отсутствие изменения ацетилирования асНЗК9 в ответ на ТГ, применение УГГ ПостК уже после первого сеанса индуцирует увеличение данной модификации в области СА1 гиппокампа. Хорошо известно, что ацетилирование гистона H3 приводит к релаксации хроматина, сопровождающейся повышением доступности регуляторных участков генов для транскрипционных факторов, что, в том числе, сопровождается стимуляцией экспрессии генов про-адаптивных белков Bcl-2, BDNF и эритропоэтина. Ранее нами было показано, что УГГ ПостК, улучшающее структурно-функциональную реабилитацию после тяжелого гипоксического воздействия, увеличивает экспрессию Bcl-2, BDNF [2], эритропоэтина, а также гипоксию индуцибельного фактора (HIF-1 α) в нейронах поля СА1 гиппокампа крыс, переживших ТГ [1]. Таким образом, несмотря на то, что ТГ не влияет на уровень ацетилирования гистона H3 по лизину 9, эта форма гистона H3 активно включается в протективные процессы, обусловленные воздействием УГГ ПостК.

Данные, полученные в настоящем исследовании, показывают, что процесс ацетилирования гистонов, в частности ацетилирования гистона H3, по-видимому, играет значительную роль в опосредовании нейропротективного эффекта гипоксического посткондиционирования. По всей видимости, это осуществляется посредством неспецифического облегчения активации основных проадаптивных генов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00624 и Программы РАН. Обработка результатов осуществлена с использованием технических возможностей ресурсного центра «Обсерватория экологической безопасности» научного парка Санкт-Петербургского государственного университета.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: Е. А. Р.

Сбор и обработка материала: Т. С. Г., О. В. В.

Статистическая обработка данных: О. В. В., К. В. С.

Анализ и интерпретация данных: Е. И. Т., О. В. В.

Написание и редактирование текста: Е. И. Т., О. В. В.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ветровой О.В., Рыбникова Е.А., Глушенко Т.С. и др. Умеренная гипобарическая гипоксия в режиме посткондиционирования повышает экспрессию HIF-1 α и эритропоэтина в СА1 поле гиппокампа крыс, переживших тяжелую гипоксию // *Нейрохимия*. 2014. Т. 31 (2). С. 134–139 [Vetrovoy O.V., Rybnikova E.A., Glushchenko T.S. Et al. Mild hypobaric hypoxic postconditioning increases the expression of HIF-1 α and erythropoietin in the CA1 field of the hippocampus of rats that survive after severe hypoxia // *Neurochemical Journal*. 2014. Vol. 8, № 2. P. 103–108].
2. Ветровой О.В., Рыбникова Е.А., Глушенко Т.С. и др. Влияние гипоксического посткондиционирования на экспрессию противоапоптотического белка Bcl-2 и нейротрофина BDNF в СА1 поле гиппокампа крыс, переживших тяжелую гипоксию // *Морфология*. 2014. Т. 145, вып. 2. С. 16–20 [Vetrovoy O.V., Rybnikova E.A., Glushchenko T.S. Et al. Effect of hypoxic postconditioning on the expression of antiapoptotic protein Bcl-2 and neurotrophin BDNF in CA1 hippocampal field of rats surviving severe hypoxia // *Morfologiya*. 2014. Vol. 145, № 2. P. 16–20. In Russ.].
3. Самойлов М.О. Мозг и адаптация (молекулярно-клеточные механизмы). СПб.: ГНИУ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 1999. 271 с. [Samoilov M.O. Brain and adaptation (molecular and cellular mechanisms). St. Petersburg: Izdatel'stvo Instituta fiziologii imeni I.P. Pavlova. 1999. 271 p. In Russ.].
4. Строев С.А., Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А. и др. Влияние пренатальной гипоксии на экспрессию тиоредексина-1 в гиппокампе крыс на разных сроках постнатального онтогенеза // *Нейрохимия*. 2011. Т. 28, № 3. С. 226–231 [Stroev S.A., Tyul'kova E.I., Vataeva L.A. et al. Effects of prenatal hypoxia on expression of thioredoxin-1 in the rat hippocampus at different stages of postnatal ontogeny // *Neurochemical Journal*. 2011. Vol. 5, № 3. P. 200–204].
5. Baillieul S., Chacaroun S., Doutréleau S. et al. Hypoxic conditioning and the central nervous system: A new therapeutic opportunity for brain and spinal cord injuries? // *Exp. Biol. Med*. 2017. Vol. 242, № 11. P. 1198–1206.
6. Gräff J., Kim D., Dobbin M.M., Tsai L.H. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes // *Physiol. Rev*. 2011. Vol. 91. P. 603–649.
7. Johnson A.B., Barton M.C. Hypoxia-induced and stress-specific changes in chromatin structure and function // *Mutat. Res*. 2007. Vol. 618, № 1–2. P. 149–162.
8. Melvin A., Rocha S. Chromatin as an oxygen sensor and active player in the hypoxia response // *Cell Signal*. 2012. Vol. 24, № 1. P. 35–43.
9. Perez-Perri J.I., Acevedo J.M., Wappner P. Epigenetics: new questions on the response to hypoxia // *Int. J. Mol. Sci*. 2011. Vol. 12. P. 4705–4721.
10. Samoilov M., Churilova A., Glushchenko T. et al. Acetylation of histones in neocortex and hippocampus of rats exposed to different modes of hypobaric hypoxia: implications for brain hypoxic injury and tolerance // *Acta Histochemica*. 2016. Vol. 118, № 2. P. 80–89.
11. Schweizer S., Meisel A., Marschenz S. Epigenetic mechanisms in cerebral ischemia // *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2013. Vol. 38. P. 1335–1346.
12. Stankiewicz A.M., Swiergiel A.H., Lisowski P. Epigenetics of stress adaptations in the brain // *Brain Res. Bull*. 2013. Vol. 98. P. 76–92.
13. Vetrovoy O., Tulkova E., Sarieva K. et al. Neuroprotective effect of hypobaric hypoxic postconditioning is accompanied by dna protection and lipid peroxidation changes in rat hippocampus // *Neurosci. Lett*. 2017. Vol. 639. P. 49–52.

Поступила в редакцию 13.03.2018

Получена после доработки 18.04.2018

CHANGES OF H3 HISTONE ACETYLATION IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS RESULTING FROM SEVERE HYPOBARIC HYPOXIA AND THE ROLE OF HYPOXIC POSTCONDITIONING

O. V. Vetrovoy^{1, 2}, T. S. Glushchenko¹, K. V. Sariyeva¹, Ye. I. Tyul'kova¹, Ye. A. Rybnikova¹

Objective: to study the effects of severe hypobaric hypoxia (SHH) and SHH followed by moderate hypobaric hypoxia in the regime of neuroprotective postconditioning (PostC) on H3 histone acetylation level in rat hippocampus neurons.

Materials and methods: Quantitative immunohistochemical method was used for estimation of the overall histone acetylation and histone H3 acetylation by Lys9 (acH3K9) which influences the conformational properties of chromatin and gene expression

in the neurons of the pyramidal layer in CA1 subfield of hippocampus in response to different modes of hypoxic exposures.

Results: SHH did not cause the substantial differences in acH3K9 level at least during 4 days after exposure. PostC by mild hypobaric hypoxia significantly upregulated acH3K9 level already at Day 1 after the first episode, possibly triggering the adaptive responses caused by PostC.

Conclusions: processes of histone, in particular, H3 histone acetylation, play an important role in neuroprotective effect of hypoxic PostC.

Key words: *hippocampus, severe hypoxia, hypoxic postconditioning, histone acetylation (Lys9)*

¹ Laboratory of Regulation of Brain Neuron Function, Russian Academy of Sciences I. P. Pavlov Institute of Physiology, 6 Makarova Nab., St. Petersburg 199034; ² Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, 7–9 Universitetskaya Nab., St. Petersburg 199034