

DOI: <https://doi.org/10.17816/PED14331-41>

Научная статья

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *TSPO* И *HIF-1α* КАК ПРЕДИКТОРОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА К ГИПЕРТЕРМИИ

А.Е. Ким¹, Е.Б. Шустов², В.А. Кашуро^{3,4}, В.П. Ганапольский¹, Е.Б. Каткова¹¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;² Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия;³ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия;⁴ Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: Ким А.Е., Шустов Е.Б., Кашуро В.А., Ганапольский В.П., Каткова Е.Б. Экспрессия генов *TSPO* и *HIF-1α* как предикторов резистентности организма к гипертермии // Педиатр. – 2023. – Т. 14. – № 3. – С. 31–41.

DOI: <https://doi.org/10.17816/PED14331-41>

АННОТАЦИЯ

Актуальность. Один из ключевых транскрипционных регуляторов, определяющих устойчивость организма к гипоксии, – гипоксия-индуцибельный фактор HIF-1α. Устойчивость организма к гипоксии определяет и устойчивость к другим критически значимым воздействиям (гипертермия, гипотермия, гипербария, ионизирующее излучение, химические вещества и др.). Однако количественной оценки этого влияния в изученной литературе обнаружить не удалось, что послужило основанием для выполнения данного исследования.

Цель – оценить значение уровня экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1α в различных тканях лабораторных животных для повышения устойчивости животных к воздействию экстремальной гипертермии.

Материалы и методы. Исследование выполнено на беспородных белых лабораторных крысах, полученных из питомника «Рапполово», массой 180–220 г. Предварительно лабораторные крысы были тестированы на индивидуальный уровень устойчивости к гипертермии (40 особей), что позволило сформировать экспериментальные группы из высокоустойчивых и низкоустойчивых к экстремальным воздействиям животных. Устойчивость к гипертермии определяли по скорости нарастания ректальной температуры при 20-минутной воздушной гипертермии (40 °С). Были сформированы 4 группы лабораторных животных (по две с высокой и низкой устойчивостью), половина из которых подвергалась выраженной гипертермии. У всех животных отбирали биологический материал (цельная кровь, плазма, ткани сердца, печени, почек, головного мозга), в котором методом Real-Time-PCR определяли экспрессию генов *HIF-1α* и *TSPO* (ген «домашнего хозяйства»). Из исследуемого материала выделяли тотальную РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля. Статистическую обработку полученных данных осуществляли методом дисперсионного анализа ANOVA.

Результаты. Установлено, что уровень устойчивости животных к гипертермии определяется их генетическими особенностями. Даже в термокомфортных условиях экспрессия гена *TSPO* животных с высоким уровнем устойчивости к гипертермии с высокой степенью достоверности отличалась от таковой у «низкоустойчивых животных». Анализ реакции системы геномной регуляции на экстремальное воздействие показал, что оно в 1,6–2 раза повышает экспрессию гена *TSPO* во всех тканях, независимо от уровня устойчивости животных. Для гена *HIF-1α* обнаружены аналогичные закономерности, но выраженность их проявлений имеет более существенный (в 1,5–2 раза для термокомфортных условий и в 1,6–2,3 раза для условий гипертермии) и достоверный характер.

Заключение. Основным органом, обеспечивающим высокий уровень устойчивости к гипоксии и гипертермии, связанным с базовой (в условиях термокомфорта) экспрессией *HIF-1α*, является головной мозг. Экспрессия в нем гена *HIF-1α* более чем в 300 раз превышает экспрессию гена *TSPO*. Вторым по значимости органом считается печень. Высокий уровень базовой экспрессии транскрипционного фактора HIF-1α в повседневных (термокомфортных) условиях может быть предиктором высокого уровня устойчивости данного животного к гипертермии.

Ключевые слова: гипертермия; гипоксия-индуцибельный фактор; индивидуальный уровень устойчивости; Real-Time-PCR.

Поступила: 17.04.2023

Одобрена: 22.05.2023

Принята к печати: 30.06.2023

DOI: <https://doi.org/10.17816/PED14331-41>

Research Article

EXPRESSION OF *TSPO* AND *HIF-1 α* GENES AS PREDICTORS OF THE ORGANISM'S RESISTANCE TO HYPERTHERMIA

Aleksey E. Kim¹, Evgeny B. Shustov², Vadim A. Kashuro^{3,4},
Vyacheslav P. Ganapolsky¹, Elena B. Katkova¹

¹ Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia;

² Golikov Research Clinical Center of Toxicology, Saint Petersburg, Russia;

³ Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia;

⁴ Herzen University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Kim AE, Shustov EB, Kashuro VA, Ganapolsky VP, Katkova EB. Expression of *TSPO* and *HIF-1 α* genes as predictors of the organism's resistance to hyperthermia. *Pediatrician (St. Petersburg)*. 2023;14(3):31–41. DOI: <https://doi.org/10.17816/PED14331-41>

ABSTRACT

BACKGROUND: One of the key transcriptional regulators that determine the body's resistance to hypoxia is the hypoxia-inducible factor HIF-1 α , the study of the role of which in the body's resistance to extreme influences can justify new directions in medical technologies for its increase. The body's resistance to hypoxia largely determines the resistance to other critically significant influences (hyperthermia, hypothermia, hyperbaria, ionizing radiation, chemicals, etc.). However, it was not possible to find a quantitative assessment of this effect in the literature studied by us, which served as the basis for this study.

AIM: To assess the role of the level of expression of the hypoxia-inducible factor HIF-1 α in various tissues of laboratory animals in increasing the resistance of animals to the effects of extreme hyperthermia.

MATERIALS AND METHODS: The study was carried out on outbred white laboratory rats obtained from the Rappolovo nursery weighing 180–220 g. For the study, preliminary laboratory animals were tested for an individual level of resistance to hyperthermia (40 animals), which made it possible to form experimental groups from highly resistant and low resistant to extreme animal influences. The definition of resistance to hyperthermia was carried out by the rate of increase in rectal temperature in animals during 20-minute air hyperthermia (40°C). 4 groups of laboratory animals were formed (2 each with high and low resistance), half of which were exposed to a pronounced adverse effect of hyperthermia. Biological material was taken from all animals (whole blood, plasma, tissues of the heart, liver, kidneys, brain), in which the expression of the *HIF-1 α* and *TSPO* genes (housekeeping gene) was determined by the Real-Time-PCR method. Statistical processing of the obtained data was carried out using the ANOVA analysis of variance.

RESULTS: It has been established that the level of resistance of animals to hyperthermia is largely determined by their genetic characteristics. Even under thermocomfort conditions, the expression of the *TSPO* “housekeeping” gene in animals with a high level of resistance to hyperthermia differed with a high degree of reliability from low-resistant animals (in the kidneys, liver, and brain, on average, by 40–60%; in the heart, by 25%). The expression values of this gene, determined in whole blood or plasma, make it possible to differentiate groups of animals according to the level of resistance to hyperthermia. A similar relationship between animals with high and low resistance is also observed in tissues obtained immediately after thermal exposure.

CONCLUSIONS: The main organ that provides a high level of resistance to both hypoxia and hyperthermia associated with the basic (under thermal comfort conditions) expression of *HIF-1 α* is the brain. The expression of the hypoxia-inducible factor in it is more than 300 times higher than the expression of the “housekeeping” genes. The second most important organ is the liver, in which *HIF-1 α* expression activity is more than 15 times higher than the expression of “housekeeping” genes. Under conditions of hyperthermia, low-resistant animals show a compensatory-adaptive reaction associated with the activation of hypoxic defense mechanisms in blood cells, kidneys, and liver, in the absence of such a reaction in the tissues of the heart and brain. Animals highly resistant to hyperthermia were characterized by a significant (30 times) increase in the relative activity of *HIF-1 α* expression mechanisms in blood cells, 2.5 times in liver cells, and a decrease in expression by 25% in the kidneys and almost 2 times in brain tissues. A high level of basal expression of the transcription factor HIF-1 α under everyday (thermocomfortable) conditions may be a predictor of a high level of resistance to hyperthermia in a given animal. Probably, to increase the body's resistance to extreme impacts, it is advisable to use medical technologies that increase the level of *HIF-1 α* expression in everyday (thermocomfortable) conditions in key tissues – the brain, liver, and myocardium.

Keywords: hyperthermia; hypoxia-inducible factor; individual resistance level; Real-Time-PCR.

Received: 17.04.2023

Revised: 22.05.2023

Accepted: 30.06.2023

АКТУАЛЬНОСТЬ

В исследовании активации генной информации, связанной с генами-регуляторами, наиболее широко используется метод сопоставления с экспрессией генов «домашнего хозяйства», которые являются высококонсервативными и стабильными для данного вида животных и их тканей. Часто с этой целью используется ген *TSPO* транслокаторного белка для переноса через митохондриальные мембраны стеролов и других субстратов. Транслокационный белок, 18 кДа (*TSPO*), — это трансмембранный полипептид, состоящий в зависимости от вида из 153–169 аминокислот, образующих пять спиральных субъединиц. *TSPO* локализуется преимущественно на наружной мембране митохондрий стероидпродуцирующих тканей многих органов, однако в наибольшей степени он обнаруживается в тканях, продуцирующих стероиды, таких как ткани надпочечников, гонад и мозга.

В центральной нервной системе *TSPO* обычно представлен в клетках микроглии и реактивных астроцитов. Как основной компонент наружной мембраны митохондрий *TSPO* опосредует различные функции митохондрий, в том числе транспорт холестерина и синтез стероидных гормонов, транспорт порфиринов, митохондриальное дыхание, открытие митохондриальных пор, апоптоз и пролиферацию клеток [6]. В ранее выполненной работе [9] было показано, что в условиях критической гипоксии экспрессия *TSPO* может значительно меняться в зависимости от степени интенсивности воздействий, что делает этот ген особенно интересным в исследованиях по экстремальной медицине.

К настоящему времени известно, что одним из ключевых транскрипционных регуляторов, определяющих устойчивость клеток организма к гипоксии, вне зависимости от ее вида и механизма формирования, является гипоксия-индуцибельный фактор 1 (HIF-1), вовлеченный в индукцию транскрипции генов гликолиза и транспортеров глюкозы, гемопоза, ангиогенеза, образования оксида азота, антиоксидантной защиты, работы клеток эндотелия, надпочечников, адренорецепторов, ростковых факторов, процессов апоптоза регенерации. Свойства HIF-1 достаточно подробно рассмотрены в ряде обзоров [2, 3, 7, 11, 19, 21]. Необходимо отметить, что к настоящему времени установлена взаимосвязь между HIF и белками теплового шока (БТШ, HSP), необходимость экспрессии HIF не только для адаптации к гипоксии, но и гипертермии, установлено влияние температуры тела на эффективность адаптации к гипоксии [4, 10, 14, 16, 17]. Показано, что температура тела влияет на уровень экспрессии

HIF-1, замыкая тем самым регуляторные механизмы перекрестной резистентности организма к экстремальным воздействиям [12].

Указанные данные и результаты, полученные другими исследователями, показывают плейотропную роль HIF в устойчивости клеток к экстремальным воздействиям, а изучение роли этого транскрипционного фактора в устойчивости организма к экстремальным воздействиям может обосновать новые направления в медицинских технологиях ее повышения [8, 20].

Устойчивость организма к гипоксии во многом определяет и устойчивость к другим критически значимым воздействиям (гипертермия, гипотермия, гипербария, ионизирующее излучение, химические вещества и др.) [13, 18, 22]. Однако количественной оценки этого влияния в отношении гипертермии в изученной нами литературе обнаружить не удалось, что послужило основанием для выполнения данного исследования.

Цель — оценить значение уровня экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1 α в различных тканях лабораторных крыс для повышения устойчивости животных к воздействию гипертермии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные и их содержание

В исследовании использовали здоровых нелинейных белых крыс-самцов с массой тела на начало исследования 180–220 г, поступивших из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская обл.) в одном привозе, с ветеринарным свидетельством, и прошедших 14-дневный карантин. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Животные содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария в клетках по 5–10 голов, при контролируемых условиях окружающей среды (при температуре 22 ± 3 °C и относительной влажности воздуха 30–70 %, световой режим — день/ночь, 12/12). Питание животных осуществлялось полнорационным комбинированным кормом для грызунов, корм и питьевая вода предоставлялись в режиме свободного доступа без ограничений. Уход за животными и их кормление обеспечивали прошедшие специальное обучение сотрудники. Для маркировки крыс использовали спиртовой раствор пикриновой кислоты. Сопоставимость экспериментальных групп обеспечивали рандомизацией животных, признанных годными для включения в исследование.

Исследование выполняли в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации¹ и приказом Минздрава России о правилах надлежащей лабораторной практики², согласно утвержденному письменному протоколу, одобренному локальной биоэтической комиссией Научно-клинического центра токсикологии им. акад. С.Н. Голикова ФМБА России.

Дизайн исследования

Для достижения поставленной цели выполнено моделирование экстремальной гипертермии в группах лабораторных животных, достоверно различающихся по уровню устойчивости к заданному воздействию. Для этого прошедшие 14-недельный карантин 40 белых беспородных крыс в фоновом исследовании предварительно тестировались на устойчивость к гипертермии.

Для дифференциации лабораторных животных по уровню тепловой устойчивости в ходе предварительных исследований были проанализированы индивидуальные кривые динамики ректальной температуры крыс при пребывании их в условиях воздействия внешней высокой температуры (вентилируемый термостат, 40 °С, влажность воздуха 37–40 %). В качестве критериальной длительности воздушной гипертермии, существенно влияющей на функциональное состояние животных, но не вызывающей их гибели, был выбран 20-минутный интервал теплового воздействия. При этом животные, для которых была характерна более высокая скорость роста ректальной температуры (0,9–1,1 °С за 20 мин), относились к термонеустойчивым животным, а с более медленным нарастанием ректальной температуры (0,4–0,7 °С за 20 мин) — к термоустойчивым.

Таким образом, по результатам выполнения в фоновом исследовании 20-минутной тепловой нагрузки на основе данных о приросте ректальной температуры были сформированы 4 экспериментальные группы по 6 животных, из них две группы (1 и 3) включали в себя животных с низким уровнем устойчивости к гипертермии, и две (2 и 4) — с высоким уровнем устойчивости к гипертермии животных, в тканях которых как при термокомфортных условиях, так и сразу после завершения 30-минутного теплового воздействия определялись значения экспрессии генов *HIF-1α* и *TSPO* в образцах тканей (плазма, цельная кровь, почки, печень, сердце и головной мозг).

¹ Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р-53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

² Приказ Минздрава России от 01 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Методика изучения экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1α в ответ на экстремальное воздействие

Сразу же после прекращения теплового воздействия животные выводились из эксперимента методом декапитации, и у них забирались образцы цельной крови, почек, печени, сердца и головного мозга. Пробы замораживались в жидком азоте и хранились до выполнения исследования в низкотемпературном холодильнике при –140 °С. Контролем служили аналогичные животные, помещаемые в работающую термокамеру без герметизации и теплового воздействия («холостой прогон», позволяющий снизить значимость стрессового фактора на животных). Из исследуемого материала выделяли тотальную РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля согласно протоколу производителя к комплекту реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «Ампли-Прайм РИБО-сорб» (ИнтерЛабСервис, Москва). Синтез первой цепи кДНК проводили согласно указаниям инструкции «Комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК РЕВЕРТА-Л» (ИнтерЛабСервис, Москва).

Амплификацию с последующим определением уровня экспрессии гена *HIF-1α* крыс проводили методом ПЦР с детекцией накопления продуктов реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR, США) с помощью детектирующего амплификатора CFX-96 (Bio-Rad, США) и специфических праймеров и зондов к гену *HIF-1α* крыс (ДНК-Синтез, Россия). Праймеры для последовательностей *HIF-1α* и *TSPO* (гену «домашнего хозяйства») были подобраны с помощью программы Vector NTI. Последовательности мРНК *HIF-1α* и *TSPO* были взяты в базе данных NCBI GenBank и синтезированы фирмой ООО «ДНК-Синтез», Москва (табл. 1).

Стадию амплификации кДНК *HIF-1α* крыс в режиме реального времени проводили в 25 мкл смеси: ПЦР-буфер (×10) — 700 мМ Трис-НСl, рН 8,6; 25 °С, 166 мМ (NH₄)₂SO₄, 25 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTPs, *Taq*-полимераза, на детектирующем амплификаторе CFX-96 (Bio-Rad, США). Условия проведения амплификации кДНК *HIF-1α* с праймерами HIF-1α_F/HIF-1α_R и зонда Z *HIF-1α*: 95 °С — 15 мин, затем 50 циклов: 95 °С — 30 с, 65 °С — 50 с, 72 °С — 30 с.

Количество исследуемых кДНК (копийных ДНК, полученных из РНК путем обратной транскрипции) в образцах рассчитывали путем определения пороговых циклов ПЦР. Для оценки уровня экспрессии гена *HIF-1α* в качестве стандарта сравнения использовался ген *TSPO*, экспрессия которого

Таблица 1 / Table 1

Праймеры и зонды для Real-Time PCR
Primers and probes for Real-Time PCR

Исследуемая мишень / Target under study	Олигонуклеотидные праймеры и зонды / Oligonucleotide primers and probes
Ген <i>HIF-1α</i> / <i>HIF-1α</i> gene	HIF_1a_F: 5-ACTCATCATGACATGTTTACTAAAGGAC-3 HIF_1a_R: 5-TGTCAAACGGAAGATGGCAG-3 Z HIF_1a: 5-ROX-TCACCACAGGACAGTACAGGATGCTTGC-BHQ1-3
Ген «домашнего хозяйства» крысы <i>TSPO</i> / <i>TSPO</i> rat “housekeeping” gene	TSPO_F: 5-AGGCTGTGGATCTTCCAGAAC-3 TSPO_R: 5-GGCTGGGCACCAGAGTGA-3 Z TSPO: 5-FAM-CAATCACTATGTCTCAATCCTGGGTACCCG-BHQ1-3

считается стабильной для животного. Нормализация количества изучаемых транскриптов к общему количеству кДНК в пробе проводилась с помощью отношения *HIF-1α/TSPO*.

Критерии соответствия

Критерии включения: беспородные лабораторные крысы-самцы массой на начало исследования 180–210 г, у которых за период наблюдения (карантин 14 дней плюс 12–15 дней после фонового тестирования устойчивости) не выявлены признаки какого-либо заболевания, и рандомизированные по уровню устойчивости к гипертермии в одну из четырех экспериментальных групп по признаку полярности устойчивости организма к экстремальному воздействию.

Критерии невключения: животные, у которых в процессе фонового тестирования устойчивости был выявлен средний (промежуточный) уровень, не позволявший отнести их к категории устойчивых или неустойчивых к гипертермии.

Критерии исключения: животные, у которых во время периода наблюдения были выявлены любые признаки какого-либо заболевания.

Рандомизация животных на группы производилась случайным выборочным методом из сформированных блоков животных с высоким или низким уровнем индивидуальной устойчивости к экстремальному воздействию.

Методы статистического анализа данных

Статистическая обработка полученных результатов проводилась в программной среде процессора таблиц Excel с помощью пакета прикладных программ «Анализ данных» методом дисперсионного анализа ANOVA. Различия между группами оценивались по *F*-критерию при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения экспрессии генов *HIF-1α* и *TSPO* в полярных по уровню устойчивости к гипертермии группах животных представлены в табл. 2–4.

Для финальной оценки экспрессии гена *HIF-1α* было выполнено его нормирование по экспрессии гена «домашнего хозяйства» *TSPO* (табл. 4).

Уровень устойчивости животных к гипертермии в существенной степени определяется их генетическими особенностями. Даже в термокомфортных условиях экспрессия гена «домашнего хозяйства» *TSPO* животных с высоким уровнем устойчивости к гипертермии со значительной степенью достоверности отличается от низкоустойчивых животных (в почках, печени и мозге — в среднем на 40–60 %, в сердце — на 25 %). Важно, что даже значения экспрессии этого гена, определяемого в цельной крови или плазме, позволяет дифференцировать группы животных по уровню устойчивости к гипертермии. Интересно, что аналогичное соотношение между животными с высокой и низкой устойчивостью к гипертермии наблюдается и в тканях, полученных сразу после теплового воздействия. Анализ реакции системы геномной регуляции на тепловое воздействие показал, что гипертермия в 1,6–2 раза повышает экспрессию гена *TSPO* в близкой степени во всех тканях, независимо от уровня устойчивости животных.

Для гена *HIF-1α* обнаружены аналогичные закономерности, но выраженность их проявлений имеет более существенный (в 1,5–2 раза для термокомфортных условий и в 1,6–2,3 раза для условий гипертермии, особенно для ткани печени и почек) и достоверный характер. Однако реакция генных механизмов на гипертермическое воздействие в группах устойчивых и неустойчивых животных не такая однородная (см. рисунок), как было отмечено для гена *TSPO*.

Таблица 2 / Table 2

Экспрессия гена *TSP0* в разных тканях в термокомфортных условиях и после 30-минутного теплового воздействия у животных с разным уровнем устойчивости к гипертермии, тыс. копий, $M \pm m$

Expression of *TSP0* gene in different tissues under thermocomfortable conditions and after 30 minute heat exposure in animals with different levels of resistance to hyperthermia, thousand copies, $M \pm m$

Ткань / Tissue	Термокомфортные условия / Thermal comfort conditions			Гипертермия / Hyperthermia		
	НУ / LR	ВУ / HR	различия / differences	НУ / LR	ВУ / HR	различия / differences
Плазма крови / Blood plasma	2,6 ± 0,6	5,0 ± 0,3	+92 %, $p = 0,006$	4,6 ± 0,6	9,2 ± 0,7	+100 %, $p = 0,009$
Цельная кровь / Whole blood	142 ± 5	284 ± 4	+99 %, $p = 7 \cdot 10^{-8}$	261 ± 15	500 ± 25	+91 %, $p = 2 \cdot 10^{-4}$
Почки / Kidneys	3240 ± 74	4491 ± 42	+54 %, $p = 5 \cdot 10^{-7}$	4800 ± 400	8249 ± 563	+72 %, $p = 0,002$
Печень / Liver	954 ± 35	1314 ± 37	+38 %, $p = 1 \cdot 10^{-4}$	1482 ± 115	2347 ± 172	+58 %, $p = 0,004$
Сердце / Heart	2203 ± 51	2780 ± 36	+27 %, $p = 3 \cdot 10^{-5}$	3470 ± 334	3986 ± 303	+15 %, $p = 0,29$
Мозг / Brain	235 ± 11	372 ± 11	+58 %, $p = 2 \cdot 10^{-5}$	445 ± 33	813 ± 13	+82 %, $p = 1 \cdot 10^{-4}$

Примечание. Группы животных: НУ — низкоустойчивые к гипоксии, ВУ — высокоустойчивые к гипоксии.

Note. Groups of animals: LR — low resistant to hypoxia, HR — highly resistant to hypoxia.

Таблица 3 / Table 3

Экспрессия гена *HIF-1a* в разных тканях в термокомфортных условиях и после воздействия гипертермии у животных с разным уровнем устойчивости к тепловому воздействию, тыс. копий, $M \pm m$

Expression of *HIF-1a* gene in different tissues under thermally comfortable conditions and after exposure to hyperthermia in animals with different levels of heat resistance, thousand copies, $M \pm m$

Ткань / Tissue	Термокомфортные условия / Thermal comfort conditions			Гипертермия / Hyperthermia		
	НУ / LR	ВУ / HR	различия / differences	НУ / LR	ВУ / HR	различия / differences
Плазма крови / Blood plasma	0,7 ± 0,1	5,8 ± 0,4	+782 %, $p = 1 \cdot 10^{-4}$	0,7 ± 0,1	23,2 ± 1,7	+3158 %, $p = 2 \cdot 10^{-4}$
Цельная кровь / Whole blood	114 ± 6	347 ± 23	+204 %, $p = 2 \cdot 10^{-4}$	653 ± 62	12960 ± 981	+1886 %, $p = 2 \cdot 10^{-4}$
Почки / Kidneys	1989 ± 47	6029 ± 51	+203 %, $p = 4 \cdot 10^{-4}$	4454 ± 205	7432 ± 363	+67 %, $p = 3 \cdot 10^{-4}$
Печень / Liver	12106 ± 462	23318 ± 1575	+93 %, $p = 0,001$	61568 ± 8442	104330 ± 2974	+69 %, $p = 0,005$
Сердце / Heart	5304 ± 262	9348 ± 125	+76 %, $p = 2 \cdot 10^{-5}$	6732 ± 246	15029 ± 928	+123 %, $p = 6 \cdot 10^{-4}$
Мозг / Brain	53631 ± 2023	112998 ± 1646	+111 %, $p = 3 \cdot 10^{-8}$	80531 ± 5350	144041 ± 38251	+79 %, $p = 0,17$

Примечание. Группы животных: НУ — низкоустойчивые к гипоксии, ВУ — высокоустойчивые к гипоксии.

Note. Groups of animals: LR — low resistant to hypoxia, HR — highly resistant to hypoxia.

Таблица 4 / Table 4

Уровень экспрессии гена *HIF-1α* в разных тканях в термокомфортных условиях и после теплового воздействия у животных с разным уровнем устойчивости к гипертермии, нормированный по активности гена *TSP0*, отн. ед., $M \pm m$
 The expression level of *HIF-1α* gene in different tissues under thermocomfortable conditions and after thermal exposure in animals with different levels of resistance to hyperthermia, normalized by *TSP0* gene activity, relative units, $M \pm m$

Ткань / Tissue	Термокомфортные условия / Thermal comfort conditions			Гипертермия / Hyperthermia		
	НУ / LR	ВУ / HR	различия / differences	НУ / LR	ВУ / HR	различия / differences
Плазма крови / Blood plasma	0,28 ± 0,04	1,17 ± 0,07	+311 %, $p = 4 \cdot 10^{-5}$	0,16 ± 0,01	2,62 ± 0,24	+1536 %, $p = 5 \cdot 10^{-4}$
Цельная кровь / Whole blood	0,81 ± 0,06	1,22 ± 0,07	+52 %, $p = 0,002$	2,52 ± 0,26	26,48 ± 3,02	+949 %, $p = 0,001$
Почки / Kidneys	0,62 ± 0,03	1,21 ± 0,01	+96 %, $p = 4 \cdot 10^{-6}$	0,94 ± 0,06	0,91 ± 0,05	-3 %, $p = 0,71$
Печень / Liver	12,7 ± 0,2	17,8 ± 1,3	+40 %, $p = 0,02$	42,3 ± 6,2	45,2 ± 2,9	+7 %, $p = 0,69$
Сердце / Heart	2,40 ± 0,08	3,34 ± 0,05	+39 %, $p = 3 \cdot 10^{-5}$	2,05 ± 0,31	3,83 ± 0,30	+86 %, $p = 0,003$
Мозг / Brain	228 ± 7	304 ± 8	+33 %, $p = 1 \cdot 10^{-4}$	184 ± 14	177 ± 47	-3 %, $p = 0,90$

Примечание. Группы животных: НУ — низкоустойчивые к гипоксии, ВУ — высокоустойчивые к гипоксии.

Note. Groups of animals: LR — low resistant to hypoxia, HR — highly resistant to hypoxia.

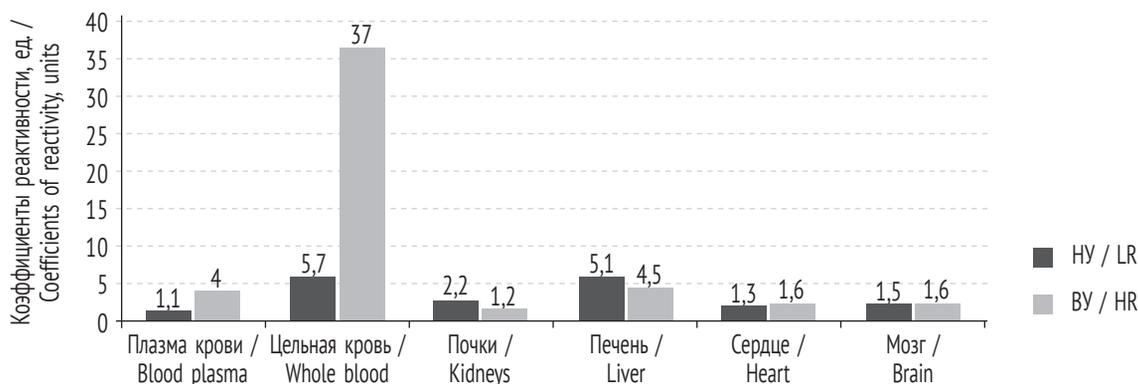


Рисунок. Коэффициенты реактивности на тепловое воздействие экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора *HIF-1α* в разных тканях в группах высоко- и низкоустойчивых животных (ВУ и НУ соответственно)

Figure. Coefficients of reactivity to thermal effects of the expression of the hypoxia-inducible factor *HIF-1α* in different tissues in groups of high- and low-resistant animals (RT and RL, respectively)

Обращает на себя внимание тот факт, что для низкоустойчивых к гипертермии животных накопление фрагментов *HIF-1α* в тесте ПЦР выше, чем для высокоустойчивых (за исключением плазмы и цельной крови, для которой у высокоустойчивых животных реактивность на гипертермию была более высокой).

При анализе литературных источников нам не удалось найти работ, решающих в прямой постановке аналогичные задачи. Однако имеются публикации, позволяющие предположить меха-

низм влияния высокого уровня экспрессии *HIF-1α* на переносимость экстремальных воздействий. Среди них можно выявить несколько групп механизмов, основным из которых является стабилизация митохондриальных функций и энергопродукции. Так, в работе [15] показана способность *HIF-1α* в большей степени активизировать гликолиз у генетически более устойчивых к гипоксии организмов. Такая активация происходила с использованием сигнального пути mTORC1/eIF4E, а для тканей головного мозга сопровождалась повышенной экспрессией

транспортера фруктозы GLUT5 и кетогексокиназы, что свидетельствует об активном вовлечении утилизации фруктозы в качестве резервного источника энергии. Доказана активация альтернативного гликолізу пути утилизации глюкозы с генерацией восстановленных эквивалентов и фосфорибозы — пентозофосфатного метаболического шунта, устойчивого к влиянию к гипоксии и митохондриальным дисфункциям, так как его реакции осуществляются на мембранах эндоплазматического ретикулума клеток [1].

Второй универсальный механизм влияния повышенной экспрессии *HIF* на устойчивость животных к экстремальным воздействиям — снижение скорости апоптоза клеток, индуцированного экстремальным воздействием (гипертермией, в частности). Показано, что у термоустойчивых животных индукция апоптоза идет медленнее, а уровень экспрессии *HIF* при этом является достоверно более высоким [10].

Третий универсальный механизм касается не столько механизмов энергопродукции, дефицитной для экстремальных состояний, сколько механизмов нейроадаптации, стабилизации функций нейронов при неблагоприятных воздействиях. Этот механизм раскрыт, в частности, в работе [5].

Представленные данные свидетельствуют, что основным органом, обеспечивающим высокий уровень устойчивости к гипертермии, связанный с базовой (в условиях термокомфорта) экспрессией *HIF-1 α* , является головной мозг. Экспрессия в нем гипоксия-индуцибельного фактора более чем в 300 раз превышает экспрессию генов «домашнего хозяйства». Вторым по значимости органом служит печень, активность экспрессии в которой *HIF-1 α* более чем 15 раз превышает экспрессию генов «домашнего хозяйства».

Выявленные особенности могут свидетельствовать, что принципиальные механизмы повышения устойчивости к тепловому воздействию для организмов со сниженным уровнем устойчивости могут протекать за счет активации экспрессии транскрипционного фактора HIF-1 α во всех органах и тканях, а также о наличии особых механизмов компенсаторно-приспособительных реакций на гипертермию в группе высокоустойчивых животных.

Важным является тот факт, что высокий уровень базовой экспрессии транскрипционного фактора HIF-1 α в повседневных (термокомфортных) условиях может быть предиктором высокого уровня устойчивости данного животного к гипертермии.

Вероятно, для повышения устойчивости организма к экстремальным воздействиям целесообразно использовать медицинские технологии,

повышающие уровень экспрессии *HIF-1 α* в повседневных (нормоксических, термокомфортных) условиях в ключевых тканях — головном мозге, печени, миокарде.

ВЫВОДЫ

1. В условиях гипертермии у низкоустойчивых животных отмечается компенсаторно-приспособительная реакция, связанная с активацией механизмов гипоксической защиты в клетках крови, почках и печени, при отсутствии такой реакции в тканях сердца и мозга.

2. Для высокоустойчивых к гипертермии животных характерным являлось существенное (в 30 раз) повышение относительной активности механизмов экспрессии *HIF-1 α* в клетках крови, в 2,5 раза — в клетках печени, и снижение экспрессии на 25 % в почках и практически в 2 раза — в тканях головного мозга.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ADDITIONAL INFORMATION

Authors' contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Competing interests. The authors declare that there is no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ветровой О.В. Роль HIF1-зависимой регуляции пентозофосфатного пути в обеспечении реакций мозга на гипоксию: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет, 2018.
2. Джалилова Д.Ш., Макарова О.В. Роль HIF-фактора, индуцируемого гипоксией, в механизмах старения // Биохимия. 2022. Т. 87, № 9. С. 1277–1300. DOI: 10.31857/S0320972522090081
3. Жукова А.Г., Казизкая А.С., Сазонтова Т.Г., Михайлова Н.Н. Гипоксией индуцируемый фактор (HIF):

- структура, функции и генетический полиморфизм // Гигиена и санитария. 2019. Т. 98, № 7. С. 723–728. DOI: 10.18821/0016-9900-2019-98-7-723-728
4. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции // Биологические мембраны. 2012. Т. 29, № 4. С. 238–252.
 5. Любимов А.В., Хохлов П.П. Участие HIF-1 в механизмах нейроадаптации к острому стрессогенному воздействию // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2021. Т. 19, № 2. С. 183–188. DOI: 10.17816/rcf192183-188
 6. Мокров Г.В., Деева О.А., Яркова М.А., и др. Транслокационный белок TSPO 18 кДа и его лиганды: перспективный подход к созданию новых нейropsychотропных средств // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2018. № 4. С. 3–27. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10026
 7. Поправка Е.С., Линькова Н.С., Трофимова С.В., Хавинсон В.Х. HIF-1 – маркер возрастных заболеваний, ассоциированных с гипоксией тканей // Успехи современной биологии. 2018. Т. 138, № 3. С. 259–272. DOI: 10.7868/S0042132418030043
 8. Серебровская Т.В. Новая стратегия в лечении болезней: гипоксия-индуцируемый фактор // Вестник Международной академии наук (Русская секция). 2006. № 1. С. 29–31.
 9. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., и др. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1 α как критерий развития гипоксии тканей // Биомедицина. 2015. № 4. С. 4–15.
 10. Huang B.-J., Cheng X.-s. Effect of hypoxia inducible factor-1 α on thermotolerance against hyperthermia induced cardiomyocytes apoptosis // Chinese J Cardiol. 2013. Vol. 41, No. 9. P. 785–789.
 11. Ke Q., Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) // Mol Pharmacol. 2006. Vol. 70, No. 5. P. 1469–1480. DOI: 10.1124/mol.106.027029
 12. Kletkiewicz H., Hyjek M., Jaworski K., et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 α in rat brain after perinatal anoxia: role of body temperature // Int J Hyperth. 2018. Vol. 34, No. 6. P. 824–833. DOI: 10.1080/02656736.2017.1385860
 13. Lee T.-K., Kim D.W., Sim H., et al. Hyperthermia accelerates neuronal loss differently between the hippocampal CA1 and CA2/3 through different HIF-1 α expression after transient ischemia in gerbils // Int J Mol Med. 2022. Vol. 49, No. 4. ID55. DOI: 10.3892/ijmm.2022.5111
 14. Leiser S.F., Begun A., Kaeberlein M. HIF-1 modulates longevity and healthspan in a temperature-dependent manner // Aging Cell. 2011. Vol. 10, No. 2. P. 318–326. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2011.00672.x
 15. Lin J., Fan L., Han Y., et al. The mTORC1/eIF4E/HIF-1 α pathway mediates glycolysis to support brain hypoxia resistance in the Gansu Zocor, *Eospalax cansus* // Front Physiol. 2021. Vol. 12. ID626240. DOI: 10.3389/fphys.2021.626240
 16. Maloyan A., Eli-Berchoer L., Semenza G.L., et al. HIF-1 α -targeted pathways are activated by heat acclimation and contribute to acclimation-ischemic cross-tolerance in the heart // Physiol Genomics. 2005. Vol. 23, No. 1. P. 79–88. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00279.2004
 17. Minet E., Mottet D., Michel G., et al. Hypoxia-induced activation of HIF-1: Role of HIF-1 α -Hsp90 interaction // FEBS Lett. 1999. Vol. 460, No. 2. P. 251–256. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01359-9
 18. Moon E.J., Sonveaux P., Porporato P.E., et al. NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment // PNAS USA. 2010. Vol. 107, No. 47. P. 20477–20482. DOI: 10.1073/pnas.1006646107
 19. Pugh C.W. Modulation of the hypoxic response. Hypoxia / ed. by R.C. Roach, P.H. Hackett, P.D. Wagner. New York: Springer, 2016. P. 259–271. DOI: 10.1007/978-1-4899-7678-9_18
 20. Semenza G.L. Pharmacologic targeting of hypoxia-inducible factors // Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2019. Vol. 59, No. 1. P. 379–403. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021637
 21. Semenza G.L. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1 // Biochem Pharmacol. 2002. Vol. 64, No. 5–6. P. 993–998. DOI: 10.1016/S0006-2952(02)01168-1
 22. Wang L., Jiang M., Duan D., et al. Hyperthermia-conditioned OECs serum-free-conditioned medium induce NSC differentiation into neuron more efficiently by the upregulation of HIF-1 alpha and binding activity // Transplantation. 2014. Vol. 97, No. 12. P. 1225–1232. DOI: 10.1097/TP.0000000000000118

REFERENCES

1. Vetrovoi O.V. *Rol' HIF1-zavisimoi regulyatsii pentozofosfatnogo puti v obespechenii reaktivnoy mozga na gipoksiyu* [dissertation abstract]. Saint Petersburg: SPbSU, 2018. (In Russ.)
2. Dzhililova DSh, Makarova O.V. Rol' HIF-faktora, induktivnogo gipoksii, v mekhanizmax stareniya. *Biochemistry (Moscow)*. 2022;87(9):1277–1300. (In Russ.) DOI: 10.31857/S0320972522090081
3. Zhukova AG, Kazitskaya AS, Sazontova TG, Mikhailova NN. Hypoxia-inducible factor (HIF): structure, function and genetic polymorphism. *Hygiene and Sanitation*. 2019;98(7):723–728. (In Russ.) DOI: 10.18821/0016-9900-2019-98-7-723-728
4. Luk'yanova LD, Kirova Yul, Sukoyan GV. Signal'nye mekhanizmy adaptatsii k gipoksii i ikh rol' v sistemnoi regulyatsii. *Biologicheskie membrany*. 2012;29(4): 238–252. (In Russ.)

5. Lyubimov AV, Khokhlov PP. Participation of HIF-1 in the mechanisms of neuroadaptation to acute stressful exposure. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2021;19(2):183–188. (In Russ.) DOI: 10.17816/rcf192183-188
6. Mokrov GV, Deeva OA, Yarkova MA, et al. Translocator protein TSPO 18 kDa and its ligands: a promising approach to the creation of new neuropsychotropic drug. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2018;(4):3–27. (In Russ.) DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10026
7. Popravka ES, Linkova NS, Trofimova SV, Khavinson VKh. HIF-1 is a marker of age-related diseases associated with tissue hypoxia. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2018;138(3):259–272. (In Russ.) DOI: 10.7868/S0042132418030043
8. Serebrovskaya TV. New strategy in treatment of diseases: hypoxia – inducible factor. *Herald of the International Academy of Science. Russian Section*. 2006;(1):29–31. (In Russ.)
9. Shustov EB, Karkischenko NN, Dulya MS, et al. The expression of hypoxia-inducible factor HIF1 α as a criterion for the development of tissue hypoxia. *Biomedicine*. 2015;(4):4–15. (In Russ.)
10. Huang B-J, Cheng X-s. Effect of hypoxia inducible factor-1 α on thermotolerance against hyperthermia induced cardiomyocytes apoptosis. *Chinese J Cardiol*. 2013;41(9):785–789.
11. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006;70(5):1469–1480. DOI: 10.1124/mol.106.027029
12. Kletkiewicz H, Hyjek M, Jaworski K, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 α in rat brain after perinatal anoxia: role of body temperature. *Int J Hyperth*. 2018;34(6):824–833. DOI: 10.1080/02656736.2017.1385860
13. Lee T-K, Kim DW, Sim H, et al. Hyperthermia accelerates neuronal loss differently between the hippocampal CA1 and CA2/3 through different HIF-1 α expression after transient ischemia in gerbils. *Int J Mol Med*. 2022;49(4):55. DOI: 10.3892/ijmm.2022.5111
14. Leiser SF, Begun A, Kaeberlein M. HIF-1 modulates longevity and healthspan in a temperature-dependent manner. *Aging Cell*. 2011;10(2):318–326. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2011.00672.x
15. Lin J, Fan L, Han Y, et al. The mTORC1/eIF4E/HIF-1 α pathway mediates glycolysis to support brain hypoxia resistance in the Gansu Zocor, *Eospalax cansus*. *Front Physiol*. 2021;12:626240. DOI: 10.3389/fphys.2021.626240
16. Maloyan A, Eli-Berchoer L, Semenza GL, et al. HIF-1 α -targeted pathways are activated by heat acclimation and contribute to acclimation-ischemic cross-tolerance in the heart. *Physiol Genomics*. 2005;23(1):79–88. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00279.2004
17. Minet E, Mottet D, Michel G, et al. Hypoxia-induced activation of HIF-1: Role of HIF-1 α -Hsp90 interaction. *FEBS Lett*. 1999;460(2):251–256. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01359-9
18. Moon EJ, Sonveaux P, Porporato PE, et al. NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment. *PNAS USA*. 2010;107(47):20477–20482. DOI: 10.1073/pnas.1006646107
19. Pugh CW. Modulation of the hypoxic response. In: Roach RC, Hackett PH, Wagner PD, editors. *Hypoxia*. New York: Springer, 2016. P. 259–271. DOI: 10.1007/978-1-4899-7678-9_18
20. Semenza GL. Pharmacologic targeting of hypoxia-inducible factors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2019;59(1):379–403. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021637
21. Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(5–6):993–998. DOI: 10.1016/S0006-2952(02)01168-1
22. Wang L, Jiang M, Duan D, et al. Hyperthermia-conditioned OECs serum-free-conditioned medium induce NSC differentiation into neuron more efficiently by the upregulation of HIF-1 α and binding activity. *Transplantation*. 2014;97(12):1225–1232. DOI: 10.1097/TP.0000000000000118

◆ Информация об авторах

*Алексей Евгеньевич Ким – канд. мед. наук, доцент кафедры фармакологии. ФГБВОУ «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4591-2997>; e-mail: alexpann@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

◆ Information about the authors

*Aleksey E. Kim – MD, PhD, Associate Professor, Department of Pharmacology, Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4591-2997>; e-mail: alexpann@mail.ru

◆ Информация об авторах

Евгений Борисович Шустов – д-р мед. наук, профессор, гл. научн. сотр. ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5895-688X>; e-mail: shustov-msk@mail.ru

Вадим Анатольевич Кашуро – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой биологической химии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры анатомии и физиологии животных и человека, ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7892-0048>; e-mail: kashuro@yandex.ru

Вячеслав Павлович Ганапольский – полковник медицинской службы, д-р мед. наук, врио заведующего кафедрой фармакологии. ФГБВОУ «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7685-5126>; e-mail: ganvp@mail.ru

Елена Борисовна Каткова – канд. мед. наук, доцент кафедры фармакологии. ФГБВОУ «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: elenaelenakatkova@mail.ru

◆ Information about the authors

Evgeny B. Shustov – MD, PhD. Dr. Med. Sci., Professor, Chief Researcher. Golikov Research Clinical Center of Toxicology, Federal Medical and Biological Agency, Saint Petersburg, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5895-688X>; e-mail: shustov-msk@mail.ru

Vadim A. Kashuro – MD, PhD, Dr. Med. Sci., Associate Professor, Head of the Department of Biological Chemistry, St. Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg, Russia; Professor of the Department of Anatomy and Physiology of Animals and Humans, Herzen University, Saint Petersburg, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7892-0048>; e-mail: kashuro@yandex.ru

Vyacheslav P. Ganapolsky – MD, PhD, Dr. Med. Sci., Colonel of the Medical Service, Acting Head of the Department of Pharmacology. Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7685-5126>; e-mail: ganvp@mail.ru

Elena B. Katkova – MD, PhD, Associate Professor, Department of Pharmacology. Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. E-mail: elenaelenakatkova@mail.ru