

УДК 616.248:[612.014.464+613.735]

## ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ТРЕНИРОВКИ НА ПАРАМЕТРЫ ЦИКЛА ОКСИДА АЗОТА ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Климанов И.А.<sup>1</sup>, Соодаева С.К.<sup>1</sup>, Попова Н.А.<sup>1</sup>, Мишарин В.М.<sup>1</sup>, Хорошаева А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, e-mail: secretary@pulmonology-russia.ru

По данным эпидемиологических исследований, в настоящее время продолжается рост заболеваемости бронхиальной астмой (БА), в том числе среди детей. Пониженная концентрация кислорода, а именно нормобарическая интервальная гипокситерапия (ИГТ), применяется в качестве эффективного нелекарственного метода лечения БА. Для мониторинга течения атопического воспаления при БА используются метаболиты оксида азота. Однако их применение при ИГТ не изучалось. В ходе проведенного исследования обнаружено, что после трехнедельной ИГТ происходит значительное (более чем в 2 раза) усиление продукции суммарного содержания нитрат- и нитрит-анионов и отдельно нитратов в КВВ у пациентов с легкой БА. Также в исследуемой группе зарегистрировано улучшение клинического состояния, определяемого по стандартизованным шкалам оценки терапии. При проведении однократного гипоксического сеанса (ОГС) обнаружены снижение уровня NO<sub>2</sub> и тенденция к снижению  $\Sigma$  NO<sub>3</sub>-/NO<sub>2</sub>- в КВВ. Отмечена положительная корреляционная связь между уровнями NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>-,  $\Sigma$  NO<sub>3</sub>-/NO<sub>2</sub>- во всех группах испытуемых. Таким образом, нам удалось прояснить некоторые особенности динамики параметров цикла NO при ИГТ и ОГС, что может способствовать расширению применения этих нелекарственных методик в клинической практике.

Ключевые слова: оксид азота, гипоксия, интервальная гипоксическая тренировка, бронхиальная астма.

## INFLUENCE OF HYPOXIC TRAINING ON THE PARAMETERS OF THE NITRIC OXIDE CYCLE IN BRONCHIAL ASTHMA

Klimanov I.A.<sup>1</sup>, Soodaeva S.K.<sup>1</sup>, Popova N.A.<sup>1</sup>, Misharin V.M.<sup>1</sup>, Horoshaeva A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution «Research Institute of Pulmonology» of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, e-mail: secretary@pulmonology-russia.ru

According to epidemiological studies, the incidence of bronchial asthma (BA) continues to grow, including among children. Reduced oxygen concentration, namely normobaric interval hypoxic therapy (IHT), is currently used as an effective non-drug treatment for AD. Nitric oxide metabolites are used to monitor the course of atopic inflammation in AD. However, their use in IHT has not been studied. In the course of the study, it was found that after a three-week IHT, there is a significant (more than 2 times) increase in the total concentration of nitrates and nitrites and separately nitrates in the EVC in children with mild asthma. At the same time, in this group, an improvement in the clinical condition was also noted, which was determined by standardized scales for assessing the therapy. When conducting a single hypoxic session (OHS), a decrease in the level of NO<sub>2</sub> and a tendency to a decrease in  $\Sigma$  NO<sub>3</sub>-/NO<sub>2</sub>- in ECA were found. A positive correlation was found between NO<sub>2</sub>-, NO<sub>3</sub>-,  $\Sigma$  NO<sub>3</sub>-/NO<sub>2</sub>- in all groups of subjects. Thus, we were able to clarify some features of the dynamics of NO cycle parameters in IHT and OHS, which may contribute to the expansion of the use of these non-drug methods in clinical practice.

Keywords: nitric oxide, hypoxia, hypoxic interval training, bronchial asthma.

Данные эпидемиологических исследований показывают, что бронхиальная астма (БА) – это одно из наиболее распространенных заболеваний респираторного тракта [1]. Продолжает отмечаться рост заболеваемости БА, в том числе и среди детей. Также увеличивается доля этого заболевания в структуре инвалидности и смертности, повышая размеры экономического ущерба [2]. Выраженная медико-социальная значимость БА требует глубокого изучения патогенеза и поиска эффективных методов ранней диагностики, профилактики и лечения [3].

Показано, что одним из ключевых механизмов патогенеза БА является оксидативный и/или нитрозивный стресс, связанный, в частности, с усилением продукции активных форм кислорода и азота (АФК и АФА соответственно) [4].

В настоящее время активно изучается роль оксида азота (NO) в механизмах развития БА. На сегодняшний день NO и целый ряд его метаболитов (нитрит- и нитрат-анионы (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup> соответственно), S-нитрозотиолы, динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), 3-нитротирозин и пр.) находят применение в диагностике и мониторинге течения БА [5].

Совокупность метаболических путей NO объединена в понятие «цикл оксида азота». Под циклом оксида азота подразумеваются NOS-зависимый и NOS-независимый пути синтеза NO, а также весь каскад окислительно-восстановительных реакций [6]. Многие этапы цикла NO являются кислородзависимыми. Известно, что процесс синтеза NO является комплексной окислительной реакцией, которую катализирует фермент NO-синтаза (NOS), присоединяющий молекулу кислорода к конечному атому азота гуанидиновой группы L-аргинина. Изучение влияния концентрации кислорода, в частности гипоксии, на цикл NO актуально еще и в свете имеющихся данных, в которых показано, что в условиях гипоксии NO может продуцироваться в NOS-независимых механизмах нитрит- и нитратредуктазноподобными ферментами (неоптерин и пр.) [7].

В настоящее время пониженная концентрация кислорода, а именно нормобарическая интервальная гипокситерапия (ИГТ), используется в качестве эффективного нелекарственного метода лечения БА. Следует отметить, что гипоксические тренировки применяются для улучшения физической работоспособности, нормализации функций физиологических систем организма, в том числе и при экстремальных условиях. ИГТ используется в качестве дополнения к традиционной терапии различных заболеваний, значимо улучшая их течение, усиливая эффективность лечения, способствуя также ограничению применения медикаментозных препаратов. Однако в настоящее время воздействие интервальной гипоксической тренировки на состояние цикла NO не изучено [8].

Цель исследования. Изучение влияния интервальной гипоксической тренировки (ИГТ) на параметры цикла NO посредством исследования динамики изменений NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> анионов, их суммарной концентрации ( $\Sigma$  NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), а также 3-нитротирозина (3-НТ) в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) на фоне ИГТ и однократного гипоксического сеанса (ОГС) пациентам с легкой атопической БА.

#### **Материалы и методы исследования**

В исследование были включены 66 пациентов. Установление диагноза осуществлялось согласно GINA (2021) и программе «Бронхиальная астма у детей «Стратегия лечения и профилактика» (2021 г.) [9]. Пациенты с БА легкого течения находились в стадии ремиссии и были разделены на 2 группы: 1-я – с ИГТ, состояла из 24 человек; 2-я – с ОГС – 22 человека. В контрольную группу вошли 20 практически здоровых детей. ИГТ проводилась в течение 21 дня. Используемая вдыхаемая гипоксическая смесь содержала 12% O<sub>2</sub>. Критерием прекращения ИГТ явилась негативная динамика соотношения SaO<sub>2</sub>/ЧСС.

КВВ собирался во всех группах обследованных и группе контроля до и после процедур ОГС или курса ИГТ. Оценка клинических проявлений БА проводилась по бальному вопроснику ACQ. В нем учитывались следующие параметры: частота пробуждений из-за симптомов БА, выраженность симптомов утром в момент пробуждения, кашель, свистящее дыхание, одышка, частота использования бронхолитиков короткого действия, ограничение деятельности из-за проявлений заболевания (от 0 до 6 баллов (max 36 баллов)) [10]. Концентрация NO<sub>2</sub>- регистрировалась спектрофотометрически с использованием реактива Грисса, Σ NO<sub>3</sub>-/NO<sub>2</sub>- измерялась аналогичным методом после восстановления NO<sub>3</sub>- до NO<sub>2</sub>- нитритредуктазой. Уровень 3-нитротирозина определялся с помощью иммуноферментного анализа.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась традиционными методами математической статистики: определялись средние значения показателей, стандартные отклонения, критерии достоверности Стьюдента (t), критерий Стьюдента для множественных сравнений с поправкой Бонферрони, U-Критерий Манна–Уитни. Исследование зависимостей между изучаемыми параметрами выполнялось с использованием метода наименьших квадратов с вычислением коэффициента корреляции. Значения p<0,05 оценивались как значимые.

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

В результате проведенного исследования у пациентов с бронхиальной астмой было отмечено:

– .. достоверное увеличение концентрации Σ NO<sub>3</sub>-/NO<sub>2</sub>- и отдельно NO<sub>3</sub>- в КВВ после курса ИГТ с 7,8 +/- 0,8 μM до 18,7 +/- 5,5 μM (p=0,034) и с 5,7 +/- 0,8 μM до 15,4 +/- 5,7 μM (p=0,025) соответственно по отношению к исходной. Однако достоверных изменений уровня NO<sub>2</sub>- в КВВ в ходе курса не обнаружено (2,6 +/- 0,7 μM до 2,1 +/- 0,7 μM, p=0,06);

– .. достоверное увеличение уровней Σ NO<sub>3</sub>-/NO<sub>2</sub>- и NO<sub>3</sub>- у этих же пациентов до и после курса ИГТ по сравнению значениями в контрольной группой, p=0,035 (рис. 1).

При этом в группе детей с легкой БА после курса ИГТ отмечалось достоверное снижение клинических проявлений БА с 2,8±0,2 балла до курса до 1,4±0,2 балла (p=0,041).

Однако после цикла ОГС не удалось выявить достоверного снижения концентраций  $\Sigma \text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  в КВВ. Отмечалась лишь тенденция к снижению уровней  $\Sigma \text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  с  $10,1 \pm 1,9 \mu\text{M}$  до  $7,4 \pm 2,3 \mu\text{M}$  и с  $7,1 \pm 1,7 \mu\text{M}$  до  $6,3 \pm 1,6 \mu\text{M}$  соответственно ( $p=0,06$  и  $p=0,054$ ). В то же время отмечено достоверное уменьшение уровня нитрит-аниона ( $2,76 \pm 0,8 \mu\text{M}$  до  $0,8 \pm 0,48 \mu\text{M}$ ,  $p=0,035$ ) (рис. 2).

В контрольной группе средние значения параметров цикла оксида азота до и после курса ИГТ составили:  $\Sigma \text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  –  $3,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$  и  $3,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$  ( $p=0,082$ );  $\text{NO}_2^-$  –  $1,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$  и  $0,98 \pm 0,31 \mu\text{M}$  ( $p=0,065$ );  $\text{NO}_3^-$  –  $2,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$  и  $3,0 \pm 0,5 \mu\text{M}$  ( $p=0,078$ ) соответственно срокам в опытных группах. Достоверных отличий между парами параметров обнаружено не было.

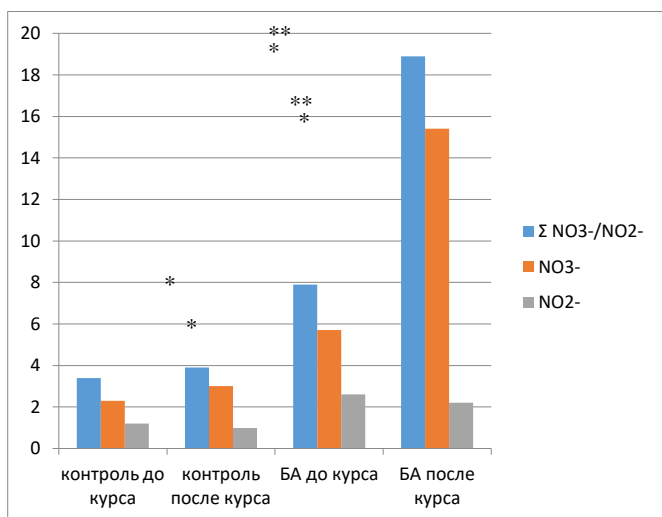


Рис. 1. Динамика параметров цикла  $\text{NO}$  в КВВ у детей с БА в ходе ИГТ

Примечания: \* – достоверно по сравнению с контрольной группой

\*\* – достоверно по сравнению с исходным значением

\* ▲

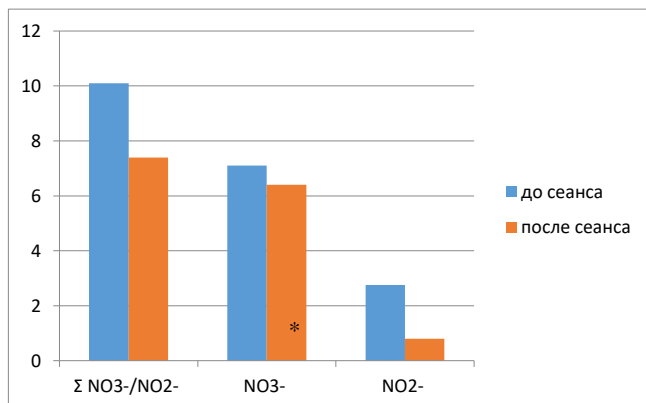


Рис. 2. Параметры цикла NO в КВВ у детей с БА при проведении ОГТ

Примечание: \* – достоверно по сравнению с исходным значением

Концентрация 3-нитротирозина в КВВ у всех группа испытуемых оказалась за пределами нижней границы методики определения.

Выявлена положительная корреляционная зависимость между уровнями NO<sub>2</sub>-, NO<sub>3</sub>-, Σ NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub> в КВВ во всех группах испытуемых (табл. 1, 2, 3).

Таблица 1

Коэффициенты корреляции между параметрами цикла NO в контрольной группе

	Σ NO <sub>3</sub> -/NO <sub>2</sub> -	NO <sub>3</sub> -	NO <sub>2</sub> -	3-нитротирозин
Σ NO <sub>3</sub> -/NO <sub>2</sub> -		0,97	0,89	–
NO <sub>3</sub> -	0,97		0,87	–
NO <sub>2</sub> -	0,89	0,87		–
3-нитротирозин	–	–	–	

Таблица 2

Коэффициенты корреляции между параметрами цикла NO в группе пациентов с БА до курса ИГТ

	Σ NO <sub>3</sub> -/NO <sub>2</sub> -	NO <sub>3</sub> -	NO <sub>2</sub> -	3-нитротирозин
Σ NO <sub>3</sub> -/NO <sub>2</sub> -		0,95	0,81	–
NO <sub>3</sub> -	0,95		0,80	–

<b>NO2-</b>	0,81	0,80		–
<b>3-нитротирозин</b>	–	–	–	–

Таблица 3

Коэффициенты корреляции между параметрами цикла NO в группе пациентов с БА после курса ИГТ

	<b>Σ NO3-/NO2-</b>	<b>NO3-</b>	<b>NO2-</b>	<b>3-нитротирозин</b>
<b>Σ NO3-/NO2-</b>		0,91	0,77	–
<b>NO3-</b>	0,91		0,71	–
<b>NO2-</b>	0,77	0,71		–
<b>3-нитротирозин</b>	–	–	–	

Таким образом, в ходе проведенного исследования выявлено, что после курса ИГТ наблюдается более чем 2-кратное увеличение уровней  $\Sigma$  NO3-/ и отдельно NO2- в КВВ у обследованных детей с легкой БА. При этом в испытуемой группе отмечается улучшение клинического состояния, определяемого по шкалам анкеты ACQ.

Механизмы выявленного изменения уровня метаболитов цикла оксида азота в КВВ могут быть связаны с рядом патофизиологических процессов. В частности, показано, что в ходе процесса адаптации к гипоксии происходит увеличение продукции, связанное с увеличением уровня внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, что, в свою очередь, может способствовать активации конститутивных, кальцийзависимых NO-синтаз в провоспалительных клетках (преимущественно в эозинофилах), других клетках респираторного тракта. Также отмечено, что длительная гипоксия может усиливать экспрессию гена iNO-синтазы. Продукция NO при этом может возрастать в несколько раз [11, 12].

В ряде работ отмечается, что гипоксические воздействия могут способствовать накоплению NO в так называемом депо. Им в биологических системах могут выступать следующие соединения: S-нитрозотиолы, динитрозольные комплексы железа (ДНКЖ). Показано, что время полураспада этих соединений может варьировать от нескольких часов до нескольких суток, в зависимости от структуры тиола [13]. Помимо этого, роль депо NO могут играть стабильные компоненты цикла NO, такие как нитрит- и нитрат-анионы. При этом показана возможность образования NO в нитрат- и нитритредуктазной компоненте цикла NO [14].

Добавлено примечание ((C1)):  $\Sigma$  NO3-/NO2-?

Также отмечено, что при гипоксии наблюдаются накопление свободного железа и увеличение уровня гемоглобина. Это также может быть стимулом для депонирования NO в форме ДНКЖ. Сам гемоглобин способен взаимодействовать с оксидом азота гемом и тиоловыми группами, изменяя баланс реакций цикла NO. Характер ИГТ предполагает смену гипоксического воздействия фазой реоксигенацией, при которой происходит усиление генерации АФК, в том числе и супероксид-анион радикала, который, в свою очередь, стимулирует выход железа из ферритина, способствуя накоплению ДНКЖ [13].

Однако, в отличие от курсовой ИГТ, при проведении пациентам однократного гипоксического сеанса и сбора КВВ непосредственно после процедуры, обнаружены снижение уровня NO<sub>2</sub> и тенденция к снижению  $\Sigma$  NO<sub>3</sub>-/NO<sub>2</sub>- в КВВ. Полученные данные могут быть объяснены особенностями синтеза оксида азота в организме. Синтез NO представляет собой ферментативную кислородзависимую комплексную окислительную реакцию, катализируемую NO-синтазой. Исходя из этого, снижение  $\Sigma$  NO<sub>3</sub>-/NO<sub>2</sub>- в КВВ может быть связано с ингибированием синтеза NO при низком парциальном давлении кислорода во вдыхаемом воздухе.

В исследовании не удалось обнаружить 3-нитротирозин в КВВ ни в одной из изученных групп. Как известно, 3-НТ является продуктом окисления тирозина и образуется, в частности, в реакциях цикла оксида азота при взаимодействии тирозина с пероксинитритом. Уровень последнего критически повышается при развитии оксидативного и нитрозивного стресса из-за усиления генерации NO и супероксид-анион радикала, которые с высокой константой скорости вступают в реакцию с образованием пероксинитрита. Таким образом, изменение уровня 3-НТ может отражать степень развития ОС и НС.

Линейная положительная связь выявлена между параметрами цикла оксида азота в группе контроля и опытных группах. Однако в ряде работ показано, что зависимость NO<sub>2</sub>- и NO<sub>3</sub>- теряет линейность с увеличением тяжести заболевания [15]. Таким образом, при легкой БА соотношение параметров цикла оксида азота не нарушено, при этом уровни изученных метаболитов превышают контрольные значения.

**Заключение.** В результате проведенного исследования выявлено, что интервальная гипоксическая тренировка существенно влияет на цикл NO, меняя соотношение компонентов цикла оксида азота в КВВ, приводя к увеличению концентрации стабильных метаболитов NO при ИГТ и тенденции снижения при ОГС. Таким образом, нам удалось прояснить некоторые особенности цикла NO при ИГТ и ОГС, что способствует расширению применения этих нелекарственных методик в клинической практике.

Исходя из того, что NO является одним из основных регуляторов многих патологических процессов (таких как вазо- и бронхоконстрикция, оксидативный и

нитрозивный стресс, воспаление и пр.), изучение влияния условий гипоксии на цикл NO является актуальной задачей и требует дальнейшего развития.

### Список литературы

1. Loftus P.A., Wise S.K. Epidemiology of asthma // *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*. 2016. Vol. 24. Is. 3. P. 245-9. DOI: 10.1097/MOO.0000000000000262.
2. Stern J., Pier J., Litonjua A. A. Asthma epidemiology and risk factors // *Seminars in Immunopathology*. 2020. Vol. 42. Is. 1. P. 5-15. DOI: 10.1007/s00281-020-00785-1.
3. Hoch H.E., Houin P.R., Stillwell P.C. Asthma in Children: A Brief Review for Primary Care Providers // *Pediatric Annals*. 2019. Vol. 48. Is. 3. P. e103-e109. DOI: 10.3928/19382359-20190219-01.
4. Климанов И.А., Соодаева С.К., Попова Н.А., Татаурова Н.Н., Хорошаева А.В. Маркеры оксидативного и нитрозивного стресса при хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астме // *Современные проблемы науки и образования*. 2022. № 5. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=32004> (дата обращения: 26.11.2023).
5. Yatera K., Mukae H. Possible pathogenic roles of nitric oxide in asthma // *Respiratory Investigation*. 2019. Vol. 57. Is. 4. P. 295-297. DOI: 10.1016/j.resinv.2019.03.007.
6. Soodaeva S., Klimanov I., Kubysheva N., Popova N., Batyrshin I. The State of the Nitric Oxide Cycle in Respiratory Tract Diseases // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020. Vol. 2020. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2020/4859260/> (дата обращения: 26.11.2023). DOI: 10.1155/2020/4859260.
7. D'Aprile A., Scrima R., Quarato G., Tataranni T., Falzetti F., Di Ianni M., Gemei M., Del Vecchio L., Piccoli C., Capitanio N. Hematopoietic stem/progenitor cells express myoglobin and neuroglobin: adaptation to hypoxia or prevention from oxidative stress? // *Stem Cells*. 2014. Vol. 32. Is. 5. P. 1267-1277. DOI: 10.1002/stem.1646.
8. Борукаева И.Х., Шаваева Ф.В., Шхагумов К.Ю., Биногерова З.Х. Интервальная гипоксическая тренировка и энтеральная оксигенотерапия в лечении детей с бронхиальной астмой // *Современные проблемы науки и образования*. 2018. № 2. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27558> (дата обращения: 13.11.2023).
9. Chippes B.E., Murphy K.R., Oppenheimer J. NAEP Guidelines Update and GINA 2021-Asthma Care Differences, Overlap, and Challenges // *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2022. Vol. 10. Is. 1S. P. S19-S30. DOI: 10.1016/j.jaip.2021.10.032.



10. Sullivan P.W., Ghushchyan V.H., Globe G. Estimating asthma control questionnaire (ACQ) scores from claims data // *Journal of Asthma*. 2018. Vol. 55. Is. 9. P. 1002-1010. DOI: 10.1080/02770903.2017.1386670.
11. Pascali F., Hemann C., Samon K., Chen C.A., Zweier J.L. Hypoxia and reoxygenation induce endothelial nitric oxide synthase uncoupling in endothelial cells through tetrahydrobiopterin depletion and S-glutathionylation // *Biochemistry*. 2014. Vol. 10. Is. 53 (22). P. 3679-88. DOI: 10.1021/bi500076r.
12. Горячева А.В., Терехина О.Л., Абрамочкин Д.В., Буданова О.П., Белкина Л.М., Смирин Б.В., Дауни Г.Ф., Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Влияние адаптации к гипоксии на экспрессию изоформ NO-синтазы в миокарде // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015. № 4. С. 73-77.
13. Anatoly F Vanin. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a "working form" of endogenous nitric oxide. *Nitric Oxide // Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016. Vol. 54. P 15-29. DOI: 10.1016/j.niox.2016.01.006.
14. Lewis S.E., Rosencrance C.B., Vallance E.D., Giromin A., Williams X.M., J-Y. Oh, Schmidt H., Straub A.C., Chantler P.D., Patel R.P., Kelley E.E. Human and rodent red blood cells do not demonstrate xanthine oxidase activity or XO-catalyzed nitrite reduction to NO // *Free Radical Biology and Medicine*. 2021. Vol. 174. P. 84-88. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.012.
15. Соодаева С.К., Климанов И.А., Марченко Т.А., Постникова Л.Б., Кубышева Н.И., Лисица А.В. Изменения метаболизма оксида азота и уровней растворимых форм дифференцировочных антигенов в конденсате выдыхаемого воздуха у ликвидаторов аварии на ЧАЭС с ХОБЛ // XIX Национальный конгресс по болезням органов дыхания: сборник трудов конгресса (Москва, 10-13 ноября 2009 г.). М.: ДизайнПресс, 2009. С. 388.