

## ВЛИЯНИЕ ИНТЕРВАЛЬНЫХ ГИПОКСИЧЕСКИХ ТРЕНИРОВОК В РАЗНЫХ РЕЖИМАХ НА ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ КРЫС

© 2024 г. К. А. Баранова<sup>1</sup>, М. Ю. Зенько<sup>1</sup>, Е. А. Рыбникова<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: rybnikovaeca@infran.ru

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принята к публикации 20.11.2023 г.

Разработка способов повышения адаптационных резервов организма и устойчивости к негативным факторам продолжает оставаться для физиологии актуальной проблемой, имеющей значительный трансляционный потенциал в сферах здравоохранения, спорта, космонавтики и народного хозяйства. Многолетние исследования авторов доказали перспективность в этом отношении гипоксического гипобарического кондиционирования в барокамере. В настоящем исследовании принципы гипобарического кондиционирования были перенесены на модель нормобарической прерывистой гипоксии/нормоксии, обусловленной вдыханием газовых смесей, которая широко используется в практике для интервальных гипоксических тренировок человека. С использованием автоматизированной установки проведен сравнительный экспериментальный анализ молекулярно-клеточных изменений крови крыс в ответ на трехдневные интервальные гипоксические тренировки при 9, 12 или 16% O<sub>2</sub> в смеси. Показано, что наибольшее по длительности и амплитуде влияние на показатели клинического анализа крови крыс оказывал наиболее интенсивный и эффективный режим 3 × 9% O<sub>2</sub>, индуцируя увеличение числа эритроцитов, снижение вариативности их объемов, а также сдвигая баланс лимфокиновых и монокиновых эффектов в сторону реакции спокойной активации. В первые сутки после тренировок при 9 и 12% кислорода достоверно снижалась общая антиоксидантная способность сыворотки с последующей быстрой нормализацией, что укладывается в динамику реакции про- и антиоксидантных систем на неповреждающую гипоксию. Выявлен характерный для кондиционирования стимулирующий эффект всех изученных режимов интервальных тренировок на базальную и стрессорную кортикостероидную активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы. Все обнаруженные посттренировочные изменения могут быть отнесены к базисным адаптивным реакциям, способствующим повышению устойчивости к неблагоприятным факторам.

*Ключевые слова:* гипоксическое прекондиционирование, нормобарическая гипоксия, интервальная гипоксическая тренировка, клинический анализ крови, общая антиоксидантная способность сыворотки, кортикостерон

## ВВЕДЕНИЕ

Интервальная гипоксическая тренировка (ИГТ) – это воздействие повторяющимися эпизодами умеренной гипоксии, чередующимися с эпизодами нормоксии или гипероксии [1]. В нормобарических условиях гипоксия достигается вдыханием газовых смесей с пониженным содержанием кислорода, обычно 10–16% [2]. Согласно многочисленным исследованиям и накопленному клиническому и санаторно-курортному опыту, ИГТ оказывает мощное неспецифическое терапевтическое действие на организм и соответственно может успешно использоваться в лечебных, оздоровительных и профилактических целях, а также применяться для повышения силы и выносливости здоровых людей и спортсменов. Несмотря на это, практический потенциал ИГТ в медицине до сих пор остается нереализованным, очевидно, вследствие недостаточности доказательной базы. Восполнить этот пробел в значительной степени могут экспериментальные исследования в моделях на животных, чем и обусловлена их актуальность.

Многолетние исследования нашей лаборатории, посвященные изучению нейропротективного и адаптогенного действия гипоксии, позволили создать и валидизировать режимы периодической гипобарической гипоксии, оказывающие широкий спектр превентивных и проадаптивных эффектов, обусловленных срочной многоуровневой мобилизацией адаптационных механизмов и повышением общей и специфической резистентности организма [см. обзор 3]. Наиболее протективным режимом оказалось трехкратное гипоксическое гипобарическое прекондиционирование с имитацией подъемов на высоту 5 000 м (эквивалентно 10% кислорода, 2 ч) с интервалом 24 ч. Использование этого режима в экспериментах на крысах позволило детально изучить молекулярно-клеточные и нейроэндокринные механизмы повышения устойчивости мозга и всего организма к таким неблагоприятным факторам, как тяжелая гипоксия и психоэмоциональные стрессы [4]. Несмотря на очевидную эффективность гипоксического гипобарического прекондиционирования, внедрение этого метода в медицинскую практику затруднено по ряду причин, среди которых риски высотной болезни и баротравм, потребность в соответствующих по характеристикам барокамерах, несоответствие рекомендациям Минздрава РФ, согласно которым разрешен “подъем” человека на высоту не выше 3500 м, и др. Вследствие этого нами была поставлена задача – разработать режимы гипоксического прекондиционирования в парадигме нормобарической гипоксии, осуществив синтез подходов ИГТ и принципов прекондиционирования, отличающихся от ИГТ, в частности, большей интенсивностью гипоксического воздействия, меньшим числом сеансов и дней воздействия. С целью решения поставленной задачи в настоящем исследовании с использованием установки для нормобарической гипоксии у грызунов проведен сравнительный экспериментальный анализ эффектов прекондиционирующих режимов  $3 \times 9\% \text{O}_2$ ,  $3 \times 12\% \text{O}_2$ ,  $3 \times 16\% \text{O}_2$  на показатели клинического анализа крови крыс, общую антиоксидантную способность сыворотки и базальную и стрессорную выработку кортикостерона гипоталамо-гипофизарно-адреноркотикальной системой.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 72 взрослых самцах крыс линии Вистар массой около 230 г из ресурсов ЦКП “Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем”. Крыс, содержащихся в стандартных условиях при свободном доступе к воде и пище, разделили на 4 группы по 18 животных – интактный контроль и 3 экспериментальные группы.

*Интервальные гипоксические тренировки*

Для проведения на лабораторных животных из экспериментальных групп исследований ИГТ использовали разработанное нами и изготовленное АО “Технопарк Санкт-Петербурга” устройство, моделирующее кратковременные состояния нормобарической гипоксии, чередующиеся с периодами нормоксии. Устройство представляло собой автоматическую установку, моделирующую нормобарическую гипоксию в полугерметичной камере с грызунами за счет вытеснения кислорода воздуха поступающим в камеру из баллона азотом, а нормоксию – за счет продувки атмосферным наружным воздухом. Установка была оснащена цифровым газоанализатором кислорода и управлялась программно с компьютера через регулирующий блок и систему клапанов и вентиляторов в соответствии с заданными параметрами и показаниями кислородного датчика, что позволило изучить ИГТ в разных режимах.

Ранее нами были протестированы на адаптационную эффективность несколько режимов ИГТ, различающихся длительностью, кратностью и интенсивностью, и для настоящего сравнительного исследования отобраны три близких к “прекондиционирующим” режима, условно ранжированных на наиболее, средние и наименее эффективный. Выбранные режимы одинаковы по длительности – 3 дня, по кратности – 3 эпизода гипоксии по 5 мин в день, различаются по интенсивности – концентрация кислорода в гипоксической смеси на уровне 9%, 12% или 16%. Таким образом, все крысы из экспериментальных групп подвергались тренировкам в установке в течение 3 дней, получая каждый день по 3 эпизода 5-минутной нормобарической гипоксии с последующей 15-минутной реоксигенацией при нормоксии (отсчет времени каждого интервала начинался с момента достижения заданного уровня кислорода). У животных из первой по интенсивности ИГТ группы содержание кислорода в газовой гипоксической смеси составляло 9% –  $3 \times 9\% \text{ O}_2$ , у среднеэффективной группы при тренировках  $\text{O}_2$  был на уровне 12% –  $3 \times 12\% \text{ O}_2$ , и группа с наименее действенным режимом ИГТ –  $3 \times 16\% \text{ O}_2$ .

*Забор и обработка крови*

На большую часть исследования, кроме определения стрессорного уровня кортикостерона (пункт *c* ниже), взятие крови проводилось при декапитации. По 6 крыс из каждой из 4 групп были декапитированы через 24 ч, 3 и 6 суток после последнего сеанса гипоксии.

а) Немедленно после декапитации дозатором отбирали около 0.2 мл туловищной крови в охлажденные ЭДТА-К3 микропробирки, осторожно переворачивали пробирки 10 раз и оставляли на холоде, периодически аккуратно перемешивая для предотвращения образования сгустков, до проведения в этот же день клинического анализа (см. далее) *цельной крови*.

б) Для получения *сыворотки post mortem* основную порцию туловищной крови после декапитации помещали в пробирки, не содержащие антикоагулянта, и оставляли примерно на 30 мин при комнатной температуре для образования сгустка. Далее центрифугировали при 3500 g в течение 15 мин при температуре 4 °C и аккуратно отбирали супернатант, стараясь не задеть подлежащий слой. Полученную сыворотку аликвотировали, замораживали и хранили при –20 °C до проведения исследования базального уровня кортикостерона или общей антиоксидантной активности (см. далее).

с) Для изучения стрессорных уровней кортикостерона использовали сыворотку *in vivo*, для чего получали периферическую кровь через 1 сутки после последнего сеанса ИГТ из хвоста у живых животных из групп Контроль,  $3 \times 9\% \text{ O}_2$ ,  $3 \times 12\% \text{ O}_2$  и  $3 \times 16\% \text{ O}_2$ ,  $n = 6$  в каждой, трехкратно – во время процедурного стресса и через 30 и 60 мин после его начала (см. ниже). Далее выделяли сыворотку, как описано в (б).

### *Клинический анализ крови*

Общий анализ крови проводился после декапитации в первые постгипоксические сутки у животных из контрольной и всех трех экспериментальных групп, а также через 3 и 6 дней после ИГТ у животных из группы  $3 \times 9\% \text{O}_2$ . Клинический анализ крови осуществлен с использованием автоматизированного гематологического анализатора BC-30 Vet (Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co.Ltd, КНР), который способен выполнять дифференцировку лейкоцитов на 3 субпопуляции и анализ проб, полученных у крыс, по 21 параметру – число лейкоцитов (WBC), лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и их процентное содержание, количество эритроцитов (RBC), тромбоцитов, крупных тромбоцитов, их относительное количество и средний объем, концентрация гемоглобина, среднее содержание и концентрация гемоглобина в эритроцитах, коэффициент вариации (RDW-CV) и стандартное отклонение (RDW-SD) ширины распределения эритроцитов, гематокрит и ширина распределения тромбоцитов, а также представляет гистограммы лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов. При анализе использовался режим предварительного разведения, для чего цельную туловищную кровь с ЭДТА добавляли в специальный разбавитель непосредственно перед помещением в геманализатор в двух параллельных пробах.

### *Общая антиоксидантная способность*

На общую антиоксидантную способность анализировали в двух параллельных пробах сыворотку туловищной крови каждого из 72 животных в данной работе, то есть всех крыс контрольной и трех ИГТ групп, декапитированных через 1, 3 и 6 суток после гипоксии. Для исследования использовали набор для колориметрического анализа (ABTS, химический метод) общей антиоксидантной способности (Т-АОС) (Elabscience Biotechnology Inc., КНР). Для оценки антиоксидантной способности к пробе, согласно инструкции, добавляли ABTS и окислитель, окисляющий его до катион-радикала ABTS •+, который может восстанавливаться антиоксидантами пробы. Затем содержание ABTS •+ в смеси измеряли по поглощению при 734 нм с помощью планшетного спектрофотометра FlexA-200 (Hangzhou Allsheng Instruments Co.Ltd., КНР). В качестве эталонного антиоксиданта использовался тролокс, Т-АОС которого равна 1, результаты представлены в ммоль/л тролоксового эквивалента.

### *Базальный уровень кортикостерона*

В течение 6 дней после последнего эпизода гипоксии/реоксигенации проводили мониторинг состояния конечного звена гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС), которое оценивали на основании определения содержания основного глюкокортикоидного гормона крыс – кортикостерона – в сыворотке крови. Базальный уровень кортикостерона определяли у всех животных всех групп в туловищной крови, полученной при декапитации через 1, 3 и 6 дней после ИГТ. Содержание кортикостерона определяли методом твердофазного конкурентного иммуоферментного анализа с набором реагентов “Кортикостерон крыса/мышь” ИФА (ООО “Хема”, РФ) в двух параллельных пробах. Результаты окрашивания в микропланшетах анализировали с помощью спектрофотометра FlexA-200 (Hangzhou Allsheng Instruments Co.Ltd., КНР).

### *Стрессорные уровни кортикостерона*

Анализ динамики нарастания уровня кортикостерона в ответ на несильный стресс является тестом на быструю обратную глюкокортикоидную связь ГГАС. Тест проводился через 1 день после последнего сеанса ИГТ, у 6 крыс из каждой группы в нулевой точке проводили взятие крови из хвоста, держа их при этом в руках, что является про-

педурным стрессом невысокой интенсивности. Для определения стрессорного уровня кортикостерона затем производился забор периферической крови из хвоста через 30 и 60 мин. после первого взятия,  $n = 6$  для каждой точки. Выделение сыворотки и анализ содержания гормона в пробах осуществляли, как описано ранее.

#### *Анализ и представление данных*

Экспериментальные данные обрабатывали, вычисляя среднюю арифметическую величину и стандартную ошибку среднего в подгруппах животных. В каждый срок было исследовано по 6 крыс из каждой группы соответственно,  $n = 6$  для каждой точки, но при обработке показателей общего анализа крови были объединены данные подгрупп Контроль 1 сутки и Контроль 3 суток в единый массив Контроль с  $n = 12$ . Статистическую обработку проводили средствами однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (Statistica 7.0) с апостериорным сравнением методом Фишера, если распределение выборки являлось нормальным, а дисперсии групп равны. В противном случае использовали непараметрический тест ANOVA Kruskal-Wallis. Различия между группами считали достоверными при  $p \leq 0.05$ , они отмечены \* на диаграммах. Результаты по экспериментальным подгруппам представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ( $M \pm SEM$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

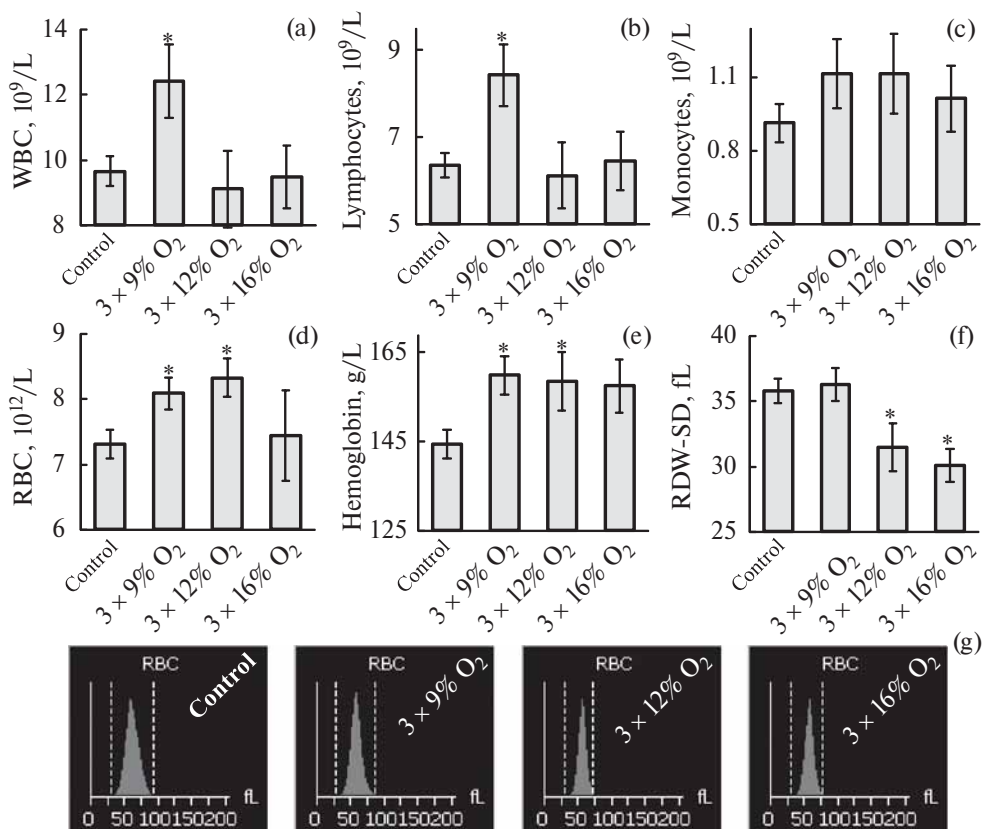
#### *Клинический анализ и лейкоцитарная формула крови в первые сутки после ИГТ в разных режимах*

С помощью ветеринарного геманализатора ВС-30 Vet был выполнен клинический анализ крови, проведена дифференцировка лейкоцитов и измерена концентрация гемоглобина в пробах туловищной крови животных контрольной группы ( $n = 12$ ) и трех групп, подвергавшихся трехкратным интервальным гипоксическим тренировкам различной интенсивности в течение трех дней ( $3 \times 9\% O_2$ ,  $3 \times 12\% O_2$  и  $3 \times 16\% O_2$ ,  $n = 6$  в каждой) через 24 ч после последней тренировки.

Для группы ИГТ  $3 \times 9\% O_2$  в первые сутки наблюдался достоверный ( $p = 0.02$ ) рост общего числа лейкоцитов (рис. 1a) до  $12.4 \pm 1.1 \times 10^9$  клеток/л от контрольных  $9.7 \pm \pm 0.5$ , который происходил в основном за счет увеличения более чем на 25% количества лимфоцитов ( $p < 0.01$ , рис. 1b), содержание которых в трех пробах этой группы настолько превышало норму для здоровых крыс, что классифицировалось анализатором как лимфоцитоз. Общее количество моноцитов в ранние сроки после ИГТ в разных режимах изменялось незначительно ( $F_{(3,24)} = 1.12$ ;  $p = 0.36$ , рис. 1c), но варьировала их доля в общем лейкоцитарном пуле ( $F_{(3,24)} = 5.17$ ;  $p < 0.01$ ). Такие показатели как общее и относительное количество гранулоцитов, тромбоцитов и крупных тромбоцитов, их объем, ширина распределения и тромбоцитоз изменений через 24 ч. после ИГТ не терпели.

Показано достоверное относительно контрольной группы ( $144.5 \pm 3.2$  г/л) увеличение содержания гемоглобина (рис. 1d) в крови в 1-е сутки в ответ на ИГТ в интенсивных режимах ( $3 \times 9\% O_2$ :  $159.8 \pm 4.2$  г/л,  $p = 0.02$ ;  $3 \times 12\% O_2$ :  $158.5 \pm 6.6$  г/л,  $p = 0.03$ ) и заметное повышение числа эритроцитов (рис. 1e) в этих условиях, разница в среднем их количестве между контролем и ИГТ группой  $3 \times 12\% O_2$  составляла  $1.02 \times \times 10^{12}$  красных кровяных клеток на литр. При этом не отмечалось значимых изменений в показателях гематокрита, среднего объема эритроцита или содержания в нем гемоглобина.

В рассматриваемые сроки отмечается позитивное влияние ИГТ на коэффициент вариации и стандартное отклонение ширины распределения эритроцитов (рис. 1f), причем именно тренировка в средне- или малоинтенсивном режиме достаточно эф-



**Рис. 1.** Влияние ИГТ в различных режимах на показатели общего анализа крови крыс через 24 ч. после окончания тренировки. (а) – общее число лейкоцитов (WBC), 10<sup>9</sup> клеток/л; (б) – количество лимфоцитов, 10<sup>9</sup>/л; (с) – число моноцитов, 10<sup>9</sup>/л; (д) – количество эритроцитов (RBC), 10<sup>12</sup>/л; (е) – концентрация гемоглобина, г/л; (ф) – стандартное отклонение ширины распределения эритроцитов (RDW-SD), фемтолитры. (г) – примеры гистограмм распределения эритроцитов (RBC) по размерам, фл. Control – контрольные интактные животные; 3 × 9% O<sub>2</sub>, 3 × 12% O<sub>2</sub> и 3 × 16% O<sub>2</sub> – группы крыс, подвергавшихся ИГТ при содержании кислорода в смеси на уровне 9, 12 или 16% соответственно.

фективно воздействует на отклонения размеров эритроцитов от среднего нормального. Например, умеренная 3 × 16% O<sub>2</sub> ИГТ снижает RDW-SD (Red Cell Distribution Width – Standard Deviation), которое соответствует ширине гистограммы (рис. 1г) на уровне 20% (пик взят за 100%), с 35.76 ± 0.95 до 31.45 ± 1.82 фл.,  $p < 0.01$ .

*Динамика изменений показателей общего анализа крови на 1-е, 3-и и 6-е сутки после интенсивной 3 × 9% O<sub>2</sub> ИГТ*

Следующим этапом работы стало проведение клинического анализа крови для группы крыс, подвергшихся наиболее эффективной интервальной тренировке при 9% кислорода в газовой смеси, через 1, 3 и 6 дней после последнего сеанса гипоксии ( $n = 6$  для каждой точки).

Для изучаемого режима 3 × 9% O<sub>2</sub> показано постепенное снижение общего количества моноцитов к 6-м суткам после гипоксии ниже контрольного уровня и более выра-

женное снижение их процентного содержания в общем числе лейкоцитов (контроль:  $9.44 \pm 0.62\%$ ;  $3 \times 9\% \text{ O}_2$  3-и сутки:  $6.58 \pm 0.58\%$ ,  $p < 0.01$ ;  $3 \times 9\% \text{ O}_2$  6-е сутки:  $6.83 \pm 0.33\%$ ,  $p < 0.01$ , рис. 2с) и одновременно заметный рост общего числа лимфоцитов с первого постгипоксического дня, с отложенным на более поздние сроки увеличением их удельной доли (контроль:  $65.96 \pm 1.48\%$ ;  $3 \times 9\% \text{ O}_2$  6-е сутки:  $72.03 \pm 0.96\%$ ,  $p < 0.01$ , рис. 2б). Увеличение процентного содержания лимфоидных клеток в лейкоцитарном пуле происходило на фоне отсроченной нормализации общего количества белых кровяных телец в поздний посттренировочный период (рис. 2а). Так, если вплоть до 3 суток после  $3 \times 9\% \text{ O}_2$  ИГТ программа гематологического анализа определяла превышение референсных интервалов по лейкоцитам в 30% проб, то к 6-м суткам средние значения опытной и контрольной групп сравнялись ( $p = 0.9$ ). На 3-и и 6-е дни после ИГТ, как и в первые 24 ч, значительных изменений по гранулоцитам и тромбоцитам выявлено не было.

Показано, что рост числа эритроцитов (рис. 2д) и уровня гемоглобина (рис. 2е) в этой группе носил транзиторный характер и к 3 суткам нивелировался. Напротив, достоверное снижение коэффициента вариации ширины распределения эритроцитов относительно контроля наблюдалось на 3-и – 6-е сутки после  $3 \times 9\% \text{ O}_2$  ИГТ (рис. 2ф, г). У контрольных животных средний RDW-CV (Red Cell Distribution Width – Coefficient of Variation) составлял  $15.7 \pm 0.3\%$ , а у тренировавшихся при 9% кислорода животных уровень вариации на 3-и сутки снижался до  $13.3 \pm 0.2\%$ ,  $p < 0.01$ , сходная тенденция прослеживалась и на 6-й день, но не в первый (рис. 2ф, г). Других эритроцитарных изменений в исследованный период времени выявлено не было.

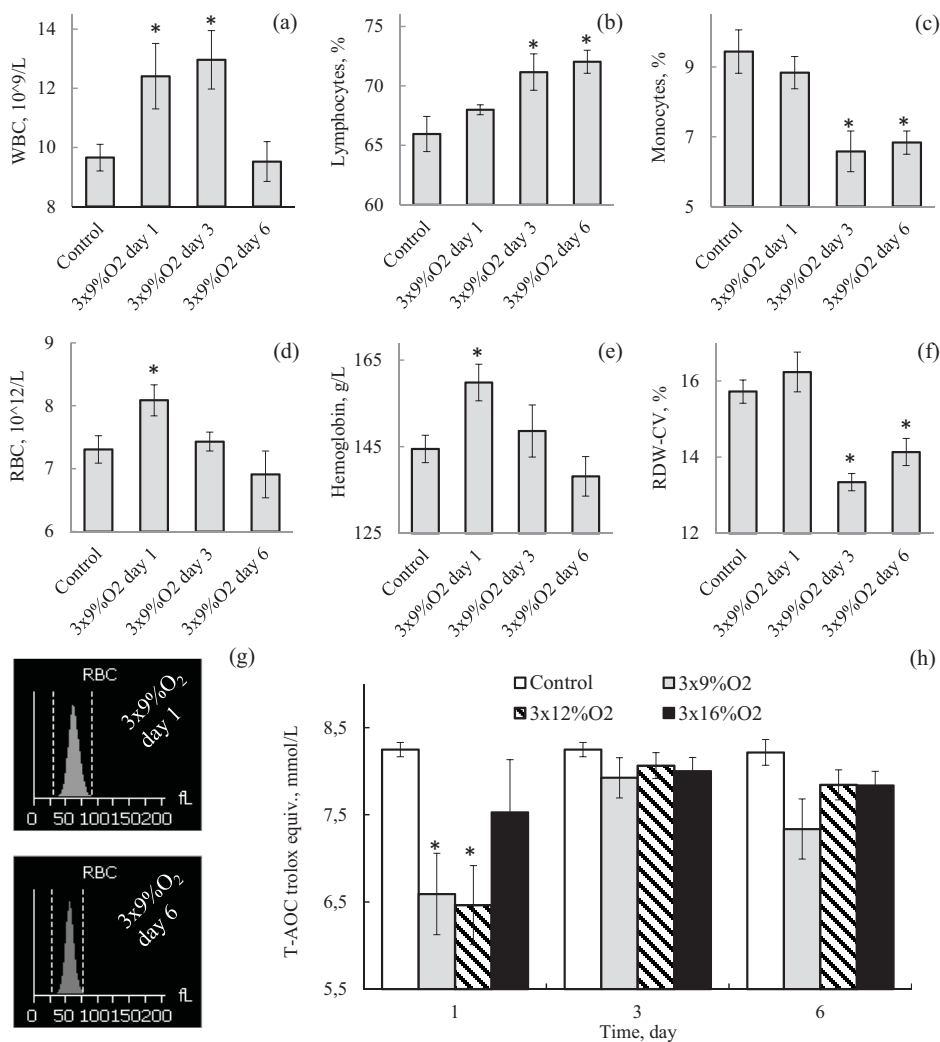
*Общая антиоксидантная способность сыворотки крови крыс на 1-е, 3-и и 6-е дни после ИГТ при 9, 12 и 16% кислорода*

Сыворотка крови крыс контрольной и трех экспериментальных ИГТ групп, полученная на 1-е, 3-и и 6-е посттренировочные дни ( $n = 6$  для каждой точки), была протестирована на так называемую общую антиоксидантную способность, что, по утверждению производителей ABTS набора реагентов, позволяет оценить условно суммарный эффект основных антиоксидантов плазмы.

На рис. 2h видно, что неэффективные тренировки в режиме  $3 \times 16\% \text{ O}_2$  практически не оказывали влияния на антиоксидантную способность крови животных на протяжении всего периода наблюдений ( $F_{(3, 19)} = 0.92$ ;  $p = 0.45$ , черные столбики). Т-АОС (Total Antioxidant Capacity) крови снижалась на 1.7–1.8 миллимоль эквивалента эталонного антиоксиданта тролокса на литр в ранний период после более интенсивных тренировок при 9% ( $p < 0.01$ , рис. 2h, серые столбики) и 12% ( $p < 0.01$ , рис. 2h, штрихованные столбики) кислорода в газовой смеси, но уже к 3-му дню антиоксидантная способность возвращалась к нормальным значениям и далее существенно не изменялась.

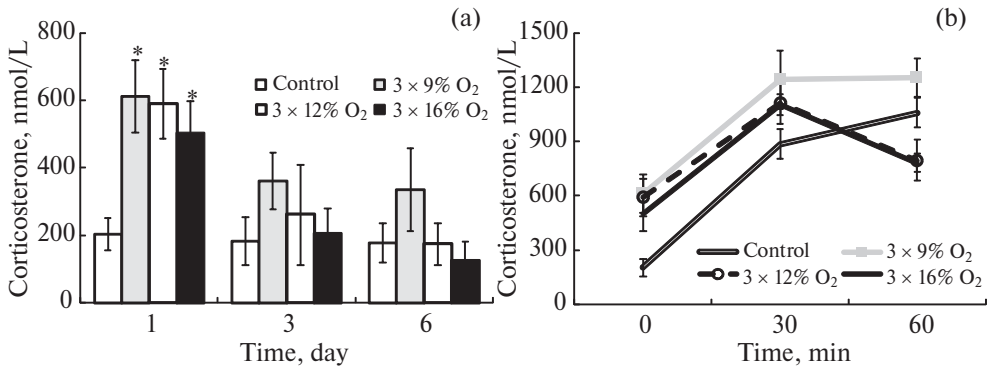
*Базальный и стрессорный уровни кортикостерона крови после разных режимов ИГТ*

Был проведен мониторинг базального уровня гормона кортикостерона в сыворотке туловищной крови в течение 6 суток после последнего сеанса ИГТ в экспериментальных группах  $3 \times 9\% \text{ O}_2$ ,  $3 \times 12\% \text{ O}_2$  и  $3 \times 16\% \text{ O}_2$  и у контрольных животных ( $n = 6$  в каждой точке). Выявлено, что нормобарические гипоксические тренировки во всех протестированных режимах сопровождались практически трехкратным повышением содержания данного глюкокортикоидного гормона выше контрольных значений в ранний постгипоксический период ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p = 0.02$ , рис. 3а, первый день). В группе интенсивной ИГТ  $3 \times 9\% \text{ O}_2$  наблюдалась незначительная тенденция к более градуальной нормализации уровня кортикостерона (Контроль 3-и сутки:  $183 \pm 71$  нмоль/л;  $3 \times 9\% \text{ O}_2$  3-и сутки:  $361 \pm 84$  нмоль/л,  $p = 0.1$ ; Контроль 6-е сутки:



**Рис. 2.** Динамика изменений клеточной формулы крови на 1-е, 3-и и 6-е сутки после ИГТ в режиме  $3 \times 9\% O_2$  (a-g) и общей антиоксидантной способности сыворотки после ИГТ при 9, 12 и 16% кислорода (f). (a) – общее количество лейкоцитов (WBC),  $10^9$  клеток/л. (b) – доля лимфоцитов от общего числа лейкоцитов, %. (c) – относительное процентное содержание моноцитов, %. (d) – количество эритроцитов (RBC),  $10^{12}/л$ . (e) – концентрация гемоглобина, г/л. (f) – коэффициент вариации ширины распределения эритроцитов (RDW-CV), %. (g) – гистограммы распределения эритроцитов, фл. (h) – общая антиоксидантная способность (Т-АОС) сыворотки крови в тролоксовом эквиваленте, ммоль/л. Обозначения: Белые столбики – Control, контрольная группа, не проходившая ИГТ; серые –  $3 \times 9\% O_2$ , группа ИГТ при уровне кислорода 9%; штрихованные –  $3 \times 12\% O_2$ , крысы, тренировавшиеся при оксигенации 12%; черные –  $3 \times 16\% O_2$ , содержание кислорода в смеси для ИГТ животных составляло 16%.





**Рис. 3.** Влияние ИГТ на базальный (а) и стрессорный (б) уровни кортикостерона в сыворотке крови. По оси абсцисс – дни после последнего сеанса ИГТ (а) или минуты от начала процедурного стресса (б); по оси ординат – содержание кортикостерона в сыворотке, нмоль/л. Остальные обозначения – как на рис. 2.

177 ± 57 нмоль/л; 3 × 9% O<sub>2</sub> 6-е сутки: 334 ± 122 нмоль/л,  $p = 0.2$ , рис. 3а, серые столбики), он до 6-го дня оставался недостоверно условно повышенным. У остальных животных постгипоксический выброс гормона носил еще более кратковременный характер.

Вторым этапом гормональных исследований последствий ИГТ стала оценка динамики постстрессорных изменений уровня кортикостерона в периферической крови крыс, проведенная через 24 ч после последней тренировки ( $n = 6$  для каждой точки). Так называемый тест на глюкокортикоидную быструю обратную связь у контрольной группы продемонстрировал нормальную реактивность ГГАС в ответ на процедурный стресс, что выражалось в нарастании стрессорного уровня кортикостерона с первой по 60-ю минуту наблюдения (рис. 3б, белая линия). У животных, подвергшихся ИГТ в режимах 3 × 12% O<sub>2</sub> и 3 × 16% O<sub>2</sub>, уровень кортикостерона в сыворотке на 60-й минуте после начального взятия крови оказывался ниже, чем к 30-минутному сроку ( $F_{(3, 20)} = 4.25$ ,  $p = 0.02$ ), что может свидетельствовать о преждевременной инактивации ГГАС и раннем включении быстрого глюкокортикоидного торможения (рис. 3б, черная и пунктирная линии). В группе ИГТ 3 × 9% O<sub>2</sub> содержание стрессорного гормона в часовой точке не снижалось относительно 30-минутной (рис. 3б, серая линия), то есть продолжалась фаза активации ГГАС, что характерно для ее нормальной динамики в ответ на стресс.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как уже отмечалось выше, гипоксия является одним из факторов, который может быть эффективным инструментом для немедикаментозного повышения адаптационных возможностей и устойчивости организма человека. В настоящее время наиболее распространено применение гипоксического фактора в рамках подходов нормобарической ИГТ для индукции адаптивных изменений, повышающих физическую выносливость спортсменов, а также улучшающих общее состояние здоровья при санаторно-курортном лечении. Большой потенциал ИГТ для медицины остается практически нереализованным вследствие того, что индуцируемые ИГТ механизмы изучены достаточно слабо, в том числе мало внимания уделяется изменениям, индуцируемым гипоксическими тренировками в крови. На сегодня известно, что ИГТ увеличивает концентрацию в крови эритропоэтина, который способен стимулировать эритропоэз и гемопоэз, снижает уровень лактата и повышает содержание щелочной фосфатазы [по 5]. Однако стоит отметить, что каждое конкретное исследование и его результаты

зависят от многих факторов и, прежде всего, от протокола тренировок, сопутствующих нагрузок, а также от выборки испытуемых, их возраста, пола, здоровья и т.д. Наибольшее число обнаруженных работ посвящены тренировкам спортсменов в длительном режиме. Например, у спортсменов-велосипедистов через 2 суток после 10 дней ИГТ отмечен рост концентрации лактата в крови [6], после 3-недельной ИГТ у профессиональных гребцов достоверно снижался уровень лейкоцитов, остальные показатели крови не изменялись или совпадали с таковыми после тренировки при нормоксии [7], ИГТ в течение 6 недель приводили к повышению содержания эритропозтина, гематокрита и числа нейтрофилов, снижая количество лимфоцитов у бегуний-любителей [8].

В данной работе было показано, что на ранних сроках после краткосрочной пре-кондиционирующей ИГТ в интенсивных режимах увеличивается число эритроцитов и концентрация гемоглобина, а наиболее адаптационно эффективный режим  $3 \times 9\% O_2$  индуцирует долгосрочные изменения в вариативности объемов эритроцитов. В целом, любое существенное снижение парциального давления кислорода активирует выброс эритроцитов из депо и повышает содержание гемоглобина крови, тем самым улучшая газотранспортную функцию крови и соответственно увеличивая степень насыщения клеток и тканей кислородом. Обнаруженное увеличение числа эритроцитов в крови после ИГТ обратно пропорционально содержанию кислорода в газовой смеси и носит временный характер, очевидно, не затрагивая эритропоэз, что относит этот эффект к срочной адаптации, в то время как уменьшение ширины распределения эритроцитов по объему ассоциируется с более длительным адаптационным эффектом, например, с адаптацией к продолжительной физической нагрузке [9], что требует некоторого времени для напряжения регуляторных механизмов, направленных на мобилизацию функциональных резервов.

К воздействиям разных по силе эндогенных и экзогенных раздражителей любого рода (физических и психологических) наибольшей среди всех субпопуляций лейкоцитов чувствительностью обладают лимфоциты. Выраженная и длительная реакция со стороны лимфоидного ростка отмечена исключительно на наиболее интенсивное гипоксическое воздействие. У человека повышение числа лимфоцитов с одновременным падением уровня моноцитов может трактоваться как усиление иммунных процессов. Индекс иммунореактивности по Иванову [10] отражает отношение содержания лимфоцитов и эозинофилов в крови к числу моноцитов, то есть баланс лимфокиновых и монокиновых эффектов, его длительное повышение у крыс группы  $3 \times 9\% O_2$  предположительно, как и у человека, может свидетельствовать о нарастании противовоспалительных медиаторов и о благоприятной динамике иммунных реакций. Повышенному уровню лимфокиновых эффектов сопутствовало умеренное повышение индекса напряженности адаптации (по Гаркави [11]), которое можно трактовать как реакцию спокойной активации, сопровождающуюся хорошим самочувствием, повышением резистентности организма в целом, ростом местного иммунитета, гормональной активности, основного обмена.

Ключевая роль в клеточной и тканевой адаптации к дефициту кислорода принадлежит фактору транскрипции NIF-1, важным механизмом действия которого является увеличение внеклеточных сигнальных эффектов аденозина, одного из центральных регуляторов воспаления, связанного с гипоксией. Рецепторы аденозина Adora2b, экспрессирующиеся на иммунных клетках, способны оказывать как противо-, так и про-воспалительные эффекты в зависимости от срока действия и концентрации аденозина [12]. Таким образом, выявленные в данной работе особенности динамики уровня лимфоцитов могут быть обусловлены различиями в профилях активации NIF-1/аденозина после кондиционирующих трехдневных кратких ИГТ и 2–6-недельных длительных тренировок, описанных в литературе. Помимо изменений в лейкоцитарной формуле ИГТ способна повышать циркулирующие уровни некоторых воспалительных маркеров, являющихся потенциальными триггерами клеточного адаптивного перепрограм-

мирования, что приводит к терапевтическим эффектам против когнитивной дисфункции и нейропатологических изменений, как продемонстрировано для 3-недельных тренировок в режиме гипоксия/гипероксия [13] и требует дальнейшего изучения для прекодиционирующих режимов ИГТ.

Нейтрализация избыточного образования активных форм кислорода и свободных радикалов осуществляется многокомпонентной антиоксидантной системой; в плазме крови человека это, прежде всего, альбумин и мочевая кислота, а также аскорбиновая кислота, витамин Е, аминокислоты, микроэлементы, промежуточные продукты обмена и др. Общая антиоксидантная способность сыворотки, определяемая в ABST системе, позволяет дать условную оценку эффекту от основных антиоксидантов, преимущественно альбумина, урата и аскорбата. Также к настоящему времени известно, что ИГТ активирует внутриклеточные гипоксические сигнальные пути, это приводит к увеличению концентрации активных форм кислорода, которые активируют обширную защитную программу, например, способствуют увеличению синтеза митохондрий, повышению их функциональной активности и улучшению окислительного метаболизма, а также стимулируют экспрессию генов, которые в дальнейшем обеспечивают антиоксидантную и противовоспалительную цитопротекцию [14–15]. Наблюдаемое нами снижение общей антиоксидантной способности крови в 24-часовой точке после ИГТ с последующей быстрой нормализацией укладывается в динамику адаптационной реакции про- и антиоксидантных систем на гипоксию, при которой на начальном этапе показатели Т-АОС закономерно снижаются за счет оксидативного стресса, активирующего приспособительные сигнальные пути. В дальнейшем баланс восстанавливается, характеризуя достижение стадии устойчивой адаптации. Важнейшим следствием инициации редокс-сигнализации является активация факторов транскрипции NIF-1, NF-κB и AP-1, индуцирующих ферменты антиоксидантной защиты и репарации, белки теплового шока, Fe-регуляторы, эффекторы NO-синтазы, белки каналов митохондрий и др., обеспечивающих устойчивость клеток к стрессорным воздействиям и контроль процессов неспецифического и адаптивного иммунитета [16].

Нейроэндокринная система играет одну из ключевых ролей при формировании толерантности различной природы, в частности, степень резистентности организма, индуцируемая профилактическими воздействиями, зачастую коррелирует с амплитудой вызываемой ими активации ГГАС. Обнаруженный в данной работе характерный стимулирующий эффект ИГТ на базальную кортикостероидную активность ГГАС относится к базисным адаптивным механизмам. Сходное трехкратное на пике повышение уровня кортикостерона наблюдалось на раннем сроке при изучении эффективных режимов гипоксического гипобарического прекодиционирования, которые повышали устойчивость мозга к гипоксии и стрессам, в том числе за счет предотвращения гормональной дисфункции [17]. Постепенная нормализация базального уровня кортикостерона в течение нескольких дней также характерна для наиболее эффективного режима гипобарического воздействия. Помимо умеренного повышения базального уровня глюкокортикоидов у крыс в ранний период после воздействия, кондиционирующая гипобарическая гипоксия также сопровождалась возрастанием стрессореактивности ГГАС на ранних стадиях формирования гипоксической толерантности [17].

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что проведенное исследование доказало применимость принципов кондиционирования к парадигме нормобарической интервальной гипоксической тренировки. На основании сравнительного анализа протоколов разной интенсивности воздействия выявлен режим, вызывающий наибольшие проадаптивные сдвиги исследуемых показателей крови. Целесообразно дальнейшее исследование эффектов данного режима и запускаемых им физиологических реакций.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями и были одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 06/23 от 23 июня 2022 г).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (проект № 22-25-00781). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и разработка концепции работы (Е.А.Р.), дизайн работы, планирование экспериментов, сбор и обработка данных (К.А.Б., М.Ю.З.), написание и редактирование манускрипта (К.А.Б., Е.А.Р.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Колчинская АЗ, Остапенко ЛА, Цыганова ТН* (2003). Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте: Руководство для врачей. М. Медицина. [*Kolchinskaja AZ, Ostapenko LA, Tsyganova TN* (2003) Normobaric interval hypoxic training in medicine and sports: A guide for physicians. M. Medicina. (In Russ)].
2. *Караш ЮМ, Стрелков РБ, Чижов АЯ* (1988). Нормобарическая гипоксия в лечении, профилактике и реабилитации. М. Медицина. [*Karash YM, Strelkov RB, Chizhov AY* (1988) Normobaric hypoxia in treatment, prevention and rehabilitation. M. Medicina. (In Russ)].
3. *Samoilov MO, Rybnikova EA* (2013) Molecular-cellular and hormonal mechanisms of induced tolerance of the brain to extreme environmental factors. *Neurosci Behav Physi* 43: 827–837. <https://doi.org/10.1007/s11055-013-9813-1>
4. *Rybnikova E, Samoilov M* (2015) Current insights into the molecular mechanisms of hypoxic pre- and postconditioning using hypobaric hypoxia. *Front Neurosci* 9: 388. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00388>
5. *Бондаренко НН, Хомутов ЕВ, Ряполова ТЛ, Кишениа МС, Игнатенко ТС, Толстой ВА, Евтушенко ИС, Туманова СВ* (2023). Молекулярно-клеточные механизмы ответа организма на гипоксию. Ульяновск мед.-биол. журн. 2: 6–29. [*Bondarenko NN, Homutov EV, Riapolova TL, Kishenia MS, Ignatenko TS, Tolstoi VA, Evtushenko IS, Tumanova SV* (2023) Molecular and cellular mechanisms of the body's response to hypoxia. *Ulianovsk med-biol zhurn* 2: 6–29. (In Russ)]. <https://doi.org/10.34014/2227-1848-2023-2-6-29>
6. *Hamlin MJ, Marshall HC, Hellemans J, Ainslie PN, Anglem N* (2010) Effect of intermittent hypoxic training on 20 km time trial and 30 s anaerobic performance. *Scand J Med Sci Sports* 20(4): 651–661. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2009.00946.x>
7. *Teległów A, Mardyla M, Myszka M, Palka T, Maciejczyk M, Bujas P, Mucha D, Ptaszek B, Marchewka J* (2022) Effect of Intermittent Hypoxic Training on Selected Biochemical Indicators, Blood Rheological Properties, and Metabolic Activity of Erythrocytes in Rowers. *Biology* 11(10): 1513. <https://doi.org/10.3390/biology11101513>
8. *Park HY, Jung WS, Kim SW, Kim J, Lim K* (2022) Effects of Interval Training Under Hypoxia on Hematological Parameters, Hemodynamic Function, and Endurance Exercise Performance in Amateur Female Runners in Korea. *Front Physiol* 13: 919008. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.919008>
9. *Иванов ДГ, Александровская НВ, Афонькина ЕА, Ерошкин ПВ, Семенов АН, Бусыгин ДВ* (2017). Адаптационные изменения у крыс при ежедневном выполнении физической нагрузки в методике “Бег на тредбане”. *Биомедицина* 2: 4–22. [*Ivanov DG, Alexanderovskaia NV*

- Afon'kina EA, Eroshkin PV, Semenov AN, Busygin DV* (2017) Adaptive changes in rats during daily exercise in the "Treadmill Running" technique. *Biomedicina* 2: 4–22 (In Russ)].
10. *Иванов ДО, Шабалов НП, Шабалова НН, Курзина ЕА, Костючек ИИ* (2002). Лейкоцитарные индексы клеточной реактивности как показатель наличия гипо- и гиперэргического вариантов неонатального сепсиса. Электронный ресурс MedLinks. Ru Педиатрия и неонатология [Ivanov DO, Shabalov NP, Shabalova NN, Kurzina EA, Kostjuchek IN (2002) Leukocyte indices of cellular reactivity as an indicator of the presence of hypo- and hyperergic variants of neonatal sepsis. (In Russ)].
  11. *Гаркави ЛХ, Квакина ЕБ, Уколова МА* (1990). Адаптационные реакции и резистентность организма. Ростов н/Д. Изд-во Рост. ун-та. [Garkavi LH, Kvakina EB, Ukolova MA (1990) Adaptive reactions and resistance of the body. Rostov n/D. Izd-vo Rost. univer. (In Russ)].
  12. *Kiers D, Wielockx B, Peters E, van Eijk LT, Gerretsen J, John A, Janssen E, Groeneveld R, Peters M, Damen L, Meneses AM, Krüger A, Langereis JD, Zomer AL, Blackburn MR, Joosten LA, Netea MG, Riksen NP, van der Hoeven JG, Scheffer GJ, Eltzschig HK, Pickkers P, Cox M* (2018) Short-Term Hypoxia Dampens Inflammation *in vivo* via Enhanced Adenosine Release and Adenosine 2B Receptor Stimulation. *EBioMedicine* 33: 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.06.021>
  13. *Serebrovska ZO, Xi L, Tumanovska LV, Shysh AM, Goncharov SV, Khetsuriani M, Kozak TO, Pashevin DA, Dosenko VE, Virko SV, Kholin VA, Grib ON, Utko NA, Egorov E, Polischuk AO, Serebrovska TV* (2022) Response of Circulating Inflammatory Markers to Intermittent Hypoxia-Hyperoxia Training in Healthy Elderly People and Patients with Mild Cognitive Impairment. *Life (Basel)* 12(3): 432. <https://doi.org/10.3390/life12030432>
  14. *Millet GP, Roels B, Schmitt L, Woorons X, Richalet JP* (2010) Combining hypoxic methods for peak performance. *Sports Med* 40(1): 1–25. <https://doi.org/10.2165/11317920-000000000-00000>
  15. *Dringen R, Brandmann M, Hohnholt MC, Blumrich EM* (2015) Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes. *Neurochem Res* 40(12): 2570–2582. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1481-1>
  16. *Sazontova TG, Bolotova AV, Kostin NV* (2011) Hypoxia-inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ), HSPs, antioxidant enzymes and membrane resistance to ROS in endurance exercise performance after adaptive hypoxic preconditioning. *Adaptat Biol Med* 6: 161–179.
  17. *Rybnikova EA, Mironova VI, Pivina SG, Ordyan NE, Tulkova EI, Samoilo MO* (2008) Hormonal mechanisms of neuroprotective effects of the mild hypoxic preconditioning in rats. *Dokl Biol Sci* 421: 239–240. <https://doi.org/10.1134/s0012496608040054>

### **Influence of Interval Hypoxic Training in Different Regimes on the Blood Parameters of Rats**

**K. A. Baranova<sup>a</sup>, M. Y. Zenko<sup>a</sup>, and E. A. Rybnikova<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup>*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: rybnikovaea@infran.ru*

The development of ways to increase the adaptive reserves of the body and resistance to negative factors continues to be an urgent problem for physiology, which has a significant translational potential in the fields of healthcare, sports, cosmonautics and the national economy. Long-term authors studies have proved the promise in this respect of hypoxic hypobaric conditioning in a pressure chamber. In the present study, the principles of hypobaric conditioning were transferred to the model of normobaric intermittent hypoxia/normoxia caused by the inhalation of gas mixtures, which is widely used in practice for human interval hypoxic training. A comparative experimental analysis of molecular and cellular changes in the blood of rats in response to three-day interval hypoxic training at 9, 12, or 16% O<sub>2</sub> in the mixture was carried out using an automated setup. It was shown that the most intense and effective 3 × 9% O<sub>2</sub> regimen, in terms of duration and amplitude, had the greatest effect on the parameters of the clinical blood test of rats, initiating an

---

increase in the number of erythrocytes and a decrease in the variability of their volumes, and causing a shift in the balance of lymphokine and monokine effects towards a calm activation reaction. On the first day after training at 9 and 12% oxygen, the total antioxidant capacity of serum significantly decreased, followed by rapid normalization, which fits into the dynamics of the reaction of pro- and antioxidant systems to non-damaging hypoxia. The stimulating effect of all the studied regimens of interval training on the basal and stress activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system, characteristic of conditioning, was revealed. All detected post-training changes can be attributed to the basic adaptive mechanisms that increase resistance to adverse factors.

*Keywords:* hypoxic preconditioning, normobaric hypoxia, interval hypoxic training, clinical blood test, total serum antioxidant capacity, corticosterone