

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ В УСЛОВИЯХ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО РЕСПИРАТОРНОГО СОПРОТИВЛЕНИЯ

Бяловский Ю. Ю., Ракитина И. С., Абаленихина Ю. В., Щулькин А. В.

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России), 390000, ул. Полонского, д. 13, Рязань, Россия

Для корреспонденции: Бяловский Юрий Юльевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: b_uu@mail.ru

For correspondence: Yury. Yu. Byalovsky, Prof., MD, Head of the Department of Pathophysiology, Ryazan State Medical University, e-mail: b_uu@mail.ru

Information about authors:

Byalovsky Yu. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-6769-8277>

Rakitina I. S., <https://orcid.org/0000-0002-9406-1765>

Abalenikhina Yu. V., <https://orcid.org/0000-0003-0427-0967>

Shchulkin A. V., <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>

РЕЗЮМЕ

Одним из важных факторов, связанных с резистивным дыханием, является высокая продукция активных форм кислорода. Основная функция ядерного фактора эритроидного родственного фактора 2 (Nrf2) заключается в активации клеточного антиоксидантного ответа путем индукции транскрипции широкого спектра генов, которые могут бороться с вредным воздействием таких факторов, как окислительный стресс. Цель данного исследования - оценка экспрессии генов антиоксидантов GPX1 и SOD1, активируемых Nrf2 на фоне дополнительного респираторного сопротивления (ДРС). Материал и методы. В исследовании участвовали 25 практически здоровых испытуемых (13 мужчин и 12 женщин), которые последовательно дышали либо без ДРС (незатрудненное дыхание), либо с использованием ДРС величиной 40% и 60% P_{тmax}, предъявляемых на протяжении 20 минут. Проводилась оценка функции внешнего дыхания, показателей экспрессии генов Cu/Zn-SOD, GPX1 и изменений активности супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы. Результаты. На фоне 20-минутного резистивного дыхания на ДРС 60% P_{тmax} отмечено достоверное снижение активности супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы ($p < 0,05$), при этом ДРС 40% P_{тmax} не влияло на активность данных ферментов. Резистивные нагрузки 40% P_{тmax} и 60% P_{тmax} не изменяли экспрессию генов Cu/Zn-SOD и GPX1 относительно исходного донагрузочного значения. Обсуждение. При наличии утомления дыхательной мускулатуры при резистивном дыхании, избыточная активация дыхательного метаборефлекса приводит к дополнительной гиперактивации симпатoadреналовой системы и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и усилению окислительного стресса. Заключение. Резистивные нагрузки 40% P_{тmax} и 60% P_{тmax} не изменяли экспрессию генов Cu/Zn-SOD и GPX1 относительно исходного донагрузочного значения. Таким образом, лейкоцитарная Nrf2 в условиях окислительного стресса, индуцированного ДРС, не обеспечивает экспрессию генов антиоксидантной защиты. Предполагается, что избыточная работа дыхательной мускулатуры формирует метаборефлекс со стороны дыхательных мышц, запускающий окислительный стресс и воспаление на уровне скелетной мускулатуры.

Ключевые слова: дополнительное респираторное сопротивление, экспрессия генов Cu/Zn-SOD, GPX1, активность супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы.

EXPRESSION OF ANTIOXIDANT DEFENSE GENES UNDER CONDITIONS OF ADDITIONAL RESPIRATORY RESISTANCE

Byalovsky Yu. Yu., Rakitina I. S., Abalenikhina Yu. V., Shchulkin A. V.

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

SUMMARY

One of the important factors associated with resistive breathing is high production of reactive oxygen species. The main function of nuclear factor erythroid-related factor 2 (Nrf2) is to activate the cellular antioxidant response by inducing transcription of a wide range of genes that can combat the harmful effects of factors such as oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the expression of the antioxidant genes GPX1 and SOD1 activated by Nrf2 against the background of additional respiratory resistance (ARR). Material and methods. The study involved 25 practically healthy subjects (13 men and 12 women), who sequentially breathed either without ARR (unlabored breathing) or using ARR of 40% and 60% P_{тmax}, presented for 20 minutes. The function of external respiration, expression of the Cu/Zn-SOD, GPX1 genes, and changes in the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase were assessed. Results. Against the background of 20-minute resistive breathing at ARR 60% P_{тmax}, a reliable decrease in the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase was noted ($p < 0.05$), while ARR 40% P_{тmax} did not affect the activity of these enzymes. Resistive loads 40% P_{тmax} and 60% P_{тmax} did not change the expression of the Cu / Zn-SOD and GPX1 genes relative to the initial pre-load value. Discussion. In the presence of respiratory muscle fatigue dur-

ing resistive breathing, excessive activation of the respiratory metaboreflex leads to additional hyperactivation of the sympathoadrenal system and the renin-angiotensin-aldosterone system and increased oxidative stress. Conclusion. Resistive loads of 40% P_{max} and 60% P_{max} did not change the expression of the Cu/Zn-SOD and GPX1 genes relative to the initial pre-load value. Thus, leukocyte Nrf2 under conditions of oxidative stress induced by ARR does not provide expression of antioxidant defense genes. It is assumed that excessive work of the respiratory muscles forms a metaboreflex on the part of the respiratory muscles, triggering oxidative stress and inflammation at the level of skeletal muscles.

Key words: additional respiratory resistance, expression of the Cu / Zn-SOD, GPX1 genes, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity.

Дополнительное респираторное сопротивление (ДРС) вызывает дисбаланс между окислительной нагрузкой и антиоксидантной способностью в дыхательных мышцах, что приводит к окислительному стрессу, воспалению и апоптозу клеток [1; 2]. По результатам исследования людей сообщалось, что бронхообструкция увеличивала экспрессию мРНК Nrf2 и связанных с ним генов, включая GPX1 и SOD1 в бронхиальном эпителии [3], при этом экспрессия мРНК Nrf2 и связанных с ним генов была увеличена у пациентов с легкой формой ХОБЛ [4; 5]. Напротив, другие исследования сообщили, что экспрессия белка Nrf2 и мРНК была снижена в альвеолярных макрофагах у пациентов с ХОБЛ [5; 6]. Эти противоречивые данные, демонстрирующие как повышение, так и понижение экспрессии Nrf2, были сосредоточены в основном на анализе экспрессии генов; информации об экспрессии белка и последующей функциональной активности меньше. Таким образом, действие ДРС запускает механизмы окислительного стресса и воспаления, что является важным фактором патогенеза ХОБЛ.

Одним из ключевых вопросов уменьшения окислительного стресса при резистивном дыхании, является состояние собственных антиоксидантных механизмов. Повышенная генерация активных форм кислорода (АФК) может подавлять экспрессию генов, кодирующих компоненты дыхательной цепи, но также может действовать как стимул, активирующий провоспалительную передачу сигналов белками Nrf2. Фактор 2, связанный с эритроидным ядерным фактором – 2 (Nrf2, NFE2L2), является основным внутренним регулятором цитопротекторных реакций на окислительные стрессы [7]. Действуя как главный фактор транскрипции, он регулирует экспрессию различных антиоксидантных генов, включая НАД(Ф)Н-дегидрогеназу (хинон 1) (NQO1), гемоксигеназу (НО)-1 (HMOX1), тиоредоксинредуктазу 1 (TXNRD1), глутатионпероксидазу (GPX1) и супероксиддисмутаза 1 (SOD1) через сигнальный путь элемента антиоксидантного ответа (ARE) [8]. Эти антиоксидантные ферменты нейтрализуют до миллиона свободных радикалов в секунду. Это эффективный подход для снижения

окислительного стресса, воспалительной реакции, некроза, апоптоза, ферроптоза, алкаптотоза и клокотфагии. Белок-репрессор Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Keap-1) блокирует зависимую от Nrf2 транскрипцию в базальных условиях. Окислительный стресс вызывает ядерную транслокацию Nrf2, тем самым регулируя экспрессию целевого гена [9]. Исследования на животных и людях показали, что Nrf2/Keap-1 и их целевые гены защищают от воспаления и окислительного стресса, вызванного бронхообструкцией, при этом нарушение Nrf2 у мышей приводит к увеличению степени обструкции бронхов [10].

Nrf2 является критическим редокс-чувствительным фактором транскрипции. Он активируется для улучшения состояния окислительного стресса в организме, содействия выживанию клеток и поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза клеток путем регулирования индуцированной экспрессии детоксифицирующих ферментов фазы II и антиоксидантных ферментов [11]. Белок Nrf2 экспрессируется в различных тканях организма (таких как печень, почки, селезенка и сердце) и содержит семь структурных доменов (Neh1–Neh7). Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок-1 (Keap1) имеет два характерных домена, а именно димеризованный домен широкого комплекса-tramtrack-bric-abrac и двойной глициновый повтор. Ассоциация между Nrf2 и Keap1 реализуется через его N-концевой домен Neh2, который взаимодействует с DGR и отрицательно регулирует функцию Nrf2. Когда клетки подвергаются атаке активных форм кислорода (АФК) или электрофилов, Nrf2 диссоциирует от Keap1 и быстро переносится в ядро. Фосфорилированный Nrf2 образует гетеродимер с белком Maf, а затем соединяется с элементами антиоксидантного ответа (ARE), которые активируют экспрессию гемоксигеназы 1 (НО-1) [12]. Кроме того, различные протеинкиназы, такие как митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК), протеинкиназа С (ПКС) и (фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), участвуют в регуляции транскрипционной активности Nrf2, индуцируя фосфорилирование Nrf2.

Ранее мы получили результаты, свидетельствующие о том, что в условиях действия резистивных нагрузок у здоровых людей, уровень Nrf2 достоверно не меняется [13]. При этом на фоне действия сопротивления дыханию 60%P_{max}, мы отмечали достоверное снижение активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы [14]. Целью данного исследования была оценка экспрессии генов антиоксидантов GPX1 и SOD1 на фоне разных величин дополнительного респираторного сопротивления.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовали 25 практически здоровых испытуемых (13 мужчин и 12 женщин), все участники предоставили письменное информированное согласие. Возрастной

диапазон испытуемых составлял 19-24 года. Мы намеренно выбрали такой узкий возрастной диапазон испытуемых. Прежде всего – для стандартизации критериев соответствия используемой выборки – увеличения критериев включения и снижения критериев невключения и исключения. Во-вторых, при умеренных значениях выборки, в качестве степени дисперсии выборочного распределения вокруг его среднего значения, более целесообразно использовать ошибку средней (m) [15]. При этом с помощью m повышается оценка точности выборочного среднего значения, в то время как стандартное отклонение (SD) среднего значения — в большей степени обеспечивает описание разброса данных. В таблице 1. представлены некоторые физиологические показатели участников (M±m).

Таблица 1. Весоростовые данные и респираторные показатели испытуемых (M±m).
Table 1. Weight-height data and respiratory parameters of subjects (M±m).

Показатели / Indicators	Мужчины/ Men	Женщины/ Women	p
Возраст, лет/ Age, years	22,5±2,8	22,8±2,5	0,44
Рост, см / Height, cm	175,4±5,3	163,5±4,2	0,032
Масса тела, кг/ Body weight, kg	78,4±5,2	64,5±4,7	0,023
ФЖЕЛ, л/ FVC, l	5,12±0,81	4,23±0,85	0,081
ФЖЕЛ, % должного/ FVC, % required	102,6±4,6	108,2±6,8	0,15
ОФВ ₁ , л/сек/ FEV ₁ , l/sec	4,19±0,81	3,39±0,74	0,082
ОФВ ₁ , % должного/ FEV ₁ , % predicted	99,4±11,5	105,3±12,7	0,19
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ, %/ FEV ₁ /FVC, %/	78,4±5,1	82,4±3,79	0,43
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ, % должного/ FEV ₁ /FVC, % predicted	96,3±7,1	98,2±5,8	0,41

Примечания: ФЖЕЛ - форсированная жизненная емкость легких; ОФВ₁ - объем форсированного выдоха за 1 с. FVC - forced vital capacity; FEV₁ - forced expiratory volume in 1 sec.

Как следует из данных, приведенных в таблице 1, используемая выборка испытуемых была однородной, гендерные различия касались только показателей веса и роста. Отбор и рандомизация участников проходил с помощью таблицы случайных чисел. Все испытуемые заполняли анамнестическую анкету для определения критериев соответствия. Критериям включения соответствовали люди обоего пола в возрасте от 19 до 24 лет, подписавшие добровольное информированное согласие на участие в исследовании. В критерии невключения попадали испытуемые моложе

18 лет; курильщики в настоящем или в прошлом; имеющие острые или хронические заболевания органов дыхания, кровообращения, эндокринную патологию. В критерии исключения входили студенты, отказавшиеся от участия в исследовании или плохо переносящие резистивное дыхание. Данное исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол № 9 от 5 июня 2023 года).

Исследование проходило в лаборатории патофизиологии дыхания ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России в период с сентября 2023 г. по де-

кабрь 2024 г. Режим испытаний предусматривал четырехкратное исследование с интервалом 2 дня между отдельными тестами. Первый визит в лабораторию предусматривал оценку весоростовых, вентиляционных показателей и максимального внутриротового давления (P_{max}), в этот же день испытуемые знакомились с алгоритмом моделирования резистивного дыхания. Во втором, третьем и четвертом тестовых визитах испытуемых, проводилось моделирование резистивного дыхания, при этом участники дышали либо без ДРС (незатрудненное дыхание), либо, с использованием ДРС (резистивные нагрузки величиной 40% и 60% P_{max} предъвлялись на протяжении 20 минут) с оценкой функции внешнего дыхания, показателей экспрессии генов Cu/Zn-SOD, GPX1 и изменения активности супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы. В этот период, испытуемые в случайном порядке получали один нагрузочный тест (резистивную нагрузку 40% или 60% P_{max} , либо 0% P_{max} - незатрудненное дыхание). Двадцатиминутная продолжительность резистивного дыхания была использована в связи с тем, что по данным [16], эта величина времени действия ДРС приводит к утомлению дыхательных мышц.

Образцы крови для определения сигнального белка Nrf 2, экспрессии генов Cu/Zn-SOD, GPX1 и лейкоцитарной супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы в количестве 10 мл с помощью катетера кубитальной вены забирались за 5 минут до включения ДРС и сразу после завершения 20 минут резистивного дыхания. Одновременно, в указанные временные промежутки измерялись респираторные показатели и степень затруднения дыхания с помощью модифицированной шкалы Борга [17] для оценки усилий дыхательной мускулатуры в ходе преодоления ДРС.

Выделение тотальной РНК проводили набором HiPure Total RNA kit (Magen, Китай) согласно протокола производителя на колонках с силикагелевой мембраной. К осадку лейкоцитов добавляли 350 мкл RTL Lysis Buffer (лизисного буфера), содержащего 2% 2-меркаптоэтанола, тщательно ресуспендировали. Центрифугировали при 14000 г в течение 3 мин при комнатной температуре, супернатант переносили в чистую 1,5 мл пробирку. Добавляли 350 мкл RNA Binding Buffer (связывающего буфера). Переносили полученную смесь (700 мкл) на колонки. Центрифугировали при 12000 г в течение 1 мин при комнатной температуре. Полученный фильтрат удаляли. На колонку добавляли 700 мкл буфера RW1. Центрифугировали при 12000 г в течение 1 минут при комнатной температуре. Полученный фильтрат удаляли. На колонку добавляли 500 мкл буфера RW2. Центрифугировали при 12000 г в

течение 1 минут при комнатной температуре. Полученный фильтрат удаляли. Данный повторяли дважды. Для удаления остатков буфера колонку центрифугировали при 12000 г в течение 2 минут при комнатной температуре. Колонку переносили в 1,5 мл стерильную центрифужную пробирку (без ДНКазы и РНКазы). Элюцию выполняли следующим образом. Добавляли 30 мкл RNAase Free Water на центр силикагелевой мембраны колонки. Оставляли на 2 минуты при комнатной температуре. Центрифугировали при 12000 г в течение 1 минут при комнатной температуре. Оценку количества и качества выделенной РНК проводили на спектрофотометре NanoPhotometer N60 (Implen, Германия).

Аmplификацию образцов проводили в амплификаторе QuantStudio 5 Real-Time PCR (TermoFisher Scientific, США), используя набор для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green «БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2x)» (Биолабмикс, Россия). ПЦР-РВ проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 12,5 мкл 2x смеси для ОТ-ПЦР SYBR, по 1 мкл прямого и обратного праймера (0.4 мкМ) (Биолабмикс, Россия), 1 мкл матрицы кДНК, 8,5 мкл деионизированной, свободной от нуклеаз воды. ПЦР проводили при следующих условиях: обратная транскрипция при 45°C в течение 20 мин, предварительная денатурация 95°C в течение 5 мин, затем 50 циклов: денатурация (95°C, 10 с), отжиг (53°C, 15 с), элонгация (72°C, 30 с). Для каждой пары праймеров применяли отрицательный контроль – постановка ПЦР в отсутствие матрицы кДНК. Использовались следующие праймеры (Биолабмикс, Россия):

G A P D H - п р я м о й
5'-GTCCCTCTGACTTCAACAGCG-3'; обратный
5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3';

C u / Z n - S O D - п р я м о й
GAAGGTGTGGGGAAGCATTA; обратный
CCACCGTGTCTTCTGGATAGAGG;

GPX1 – прямой
ACTACACCCAGATGAACGAGC; обратный
CCCACCAGGAACCTTCTCAAA.

Расчет уровня экспрессии Cu/Zn-SOD, GPX1 относительно референсного гена был осуществлен с помощью программного обеспечения LinRegPCR v.11.0 (Heart failure research center, Нидерланды).

Активность глутатионпероксидазы оценивалась путем спектрофотометрической регистрации оптической плотности [18] с использованием спектрофотометра BioRad SmartSpec Plus («BioRad», США).

Активность супероксиддисмутазы определялась кверцитиновым методом. Изменение оптической плотности реакционной среды, которая

определялась фотометрически, была пропорциональна степени активности фермента [19].

Для проведения статистического анализа использовался пакет статистического программного обеспечения (SPSS v.22.0, США). Для подтверждения нормального распределения исследуемых данных, применялся тест Шапиро-Уилка, по результатам оценки которого, использовались параметрические методы статистической обработки. Для проверки однородности дисперсии использовался F-тест Левена. Двусторонний дисперсионный анализ (ANOVA) использовался для определения статистической значимости различий между группами для сравнения физиологических параметров в условиях действия разных величин ДРС. Для определения различий показателей при

резистивном дыхании применялся однофакторный анализ ANOVA по критерию F-статистики. Приводимые данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение при уровне статистической значимости $\alpha \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке 1 представлены изменения показателей активности лейкоцитарных супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы до предъявления резистивных нагрузок и после 20-минутного резистивного дыхания на ДРС 40%Pmmax и 60%Pmmax. С учетом повышенного разброса данных, изменения оценки средней активности антиокислительных ферментов мы проводили с учетом стандартного отклонения ($M \pm SD$).

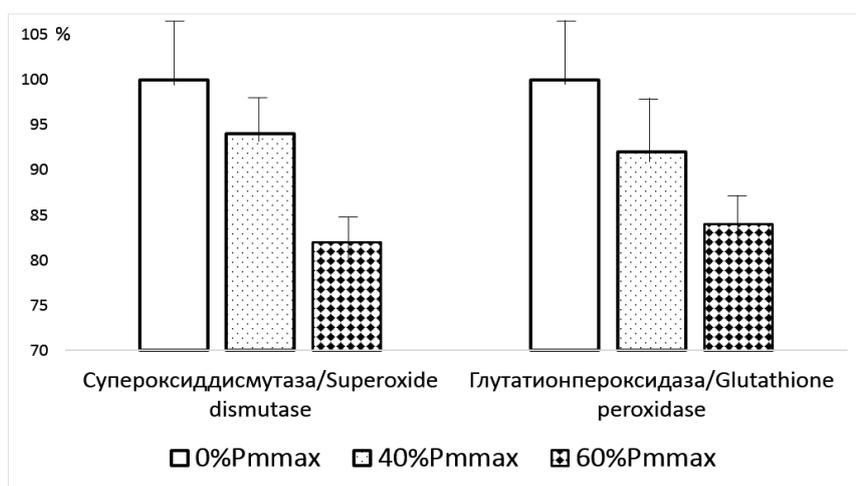


Рис. 1. Изменения активности лейкоцитарных супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы ($M \pm SD$) до предъявления резистивных нагрузок (0%Pmmax), после 20-минутного резистивного дыхания на ДРС 40%Pmmax и 60%Pmmax.

Fig. 1. Changes in the activity of leukocyte superoxide dismutase and glutathione peroxidase ($M \pm SD$) before resistive loads (0% Pmmax), after 20 minutes of resistive breathing at ARR 40% Pmmax and 60% Pmmax.

Как следует из данных, приведенных на рис.1, активность супероксиддисмутазы отнесенная к уровню исходного (незатрудненного - 0%Pmmax) дыхания (100%), в условиях двадцатиминутного дыхания на ДРС 40%Pmmax снижалась на 7,3% ($p > 0,05$), т.е. демонстрировала тенденцию к снижению антиокислительной активности. Двадцатиминутное дыхание на ДРС 60%Pmmax существенно больше снижало активность супероксиддисмутазы – на 18,2% ($p < 0,05$). Похожую динамику демонстрировала глутатион-пероксидаза: при двадцатиминутном резистивном дыхании на ДРС 40% Pmmax, антиокислительная активность снижалась весьма умеренно – на 7,3% ($p > 0,05$), что отражало тенденцию к уменьшению активности антиоксиданта. При этом 20 минут резистивного дыхания на величине ДРС 60%Pmmax

существенно и достоверно снижали активность глутатион-пероксидазы – на 16,8% относительно незатрудненного дыхания ($p < 0,05$).

Для подтверждения отсутствия эффекта активации сигнальных белков, мы использовали выраженную способность Nrf2 регулировать клеточную антиоксидантную защиту путем экспрессии генов основных антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. В качестве экспрессируемой РНК исследуемых ферментов использовали Cu/Zn-SOD и GPX1, а контрольным праймером служил GAPDH. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

Как следует из данных, представленных на рисунке 2, анализ экспрессии генов показал, что ступенчатое увеличение ДРС как на уровне 40%Pmmax, так и 60%Pmmax, достоверно не

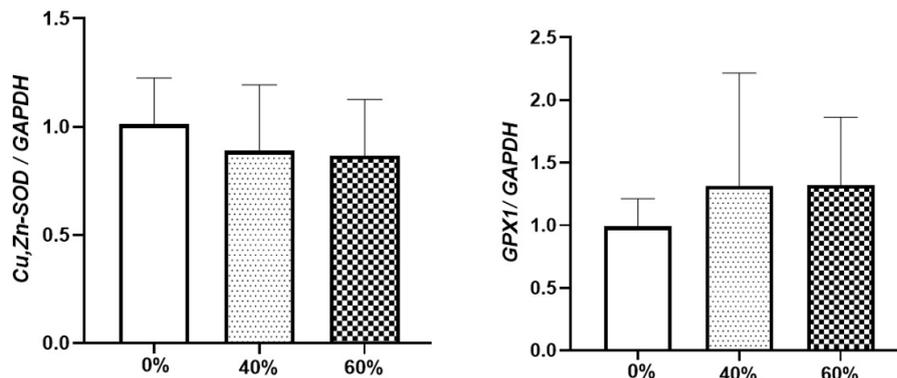


Рис. 2. Экспрессия генов Cu/Zn-SOD, GPX1 в лейкоцитах (M±SD) до предъявления резистивных нагрузок (0%Pmax), после 20-минутного резистивного дыхания на ДРС 40%Pmax и 60%Pmax.

Fig. 2. Expression of Cu/Zn-SOD, GPX1 genes in leukocytes (M±SD) before resistive loads (0%Pmax), after 20-minute resistive breathing at ARR 40%Pmax and 60%Pmax.

изменяет экспрессию генов Cu/Zn-SOD и GPX1 относительно исходного донагрузочного значения. Этот результат свидетельствует о том, что снижение активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы связано с расходом антиоксидантных ферментов в условиях окислительного стресса без восполнения за счет экспрессии лейкоцитарных генов. Таким образом, лейкоцитарная Nrf2 в условиях окислительного стресса, индуцированного ДРС, не обеспечивает экспрессию генов антиоксидантной защиты.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что Nrf2 является триггерным механизмом для запуска экспрессии генов ферментов антиокислительной защиты в условиях окислительного стресса [20], нами были получены веские доказательства того, что антиоксидантные пути, связанные с Nrf2, были неактивны в отношении экспрессии генов Cu/Zn-SOD и GPX1. Это обстоятельство, по-видимому, указывает на вторичный характер механизмов окислительного стресса в условиях ДРС. При этом собственные антиокислительные механизмы не успевают компенсировать прооксидантные эффекты, возникающие в условиях резистивного дыхания. Основным источником данных эффектов, по-видимому, является феномен, впервые исследованный С.А. Harms и соавт. в 1997 г., известный как метаборефлекс вдоха [21]. Целью данного рефлекса является поддержание достаточной доставки кислорода к дыхательным мышцам для сохранения адекватного уровня легочной вентиляции и кислотно-основного гомеостаза.

Биологический смысл метаборефлекса может иметь своей основной целью защиту доставки кислорода к дыхательным мышцам, тем самым

обеспечивая способность поддерживать легочную вентиляцию, надлежащую регуляцию газов артериальной крови, pH и общий организменный гомеостаз. Предположительно, как «жизненно важный орган», ответственный за поддержку легочной функции, перфузия дыхательных мышц, особенно во время физиологических состояний, в которых существует конкуренция за сердечный выброс, таких как резистивное дыхание, имеет приоритет над локомоторными мышцами. В настоящее время отсутствуют научные данные, позволяющие определить конкретный вид метаболита, который активирует мышечный метаборефлекс [22]. Тем не менее, калий, молочная кислота, аденозин, дипротонированный фосфат, арахидоновая кислота, простагландины, капсаицин и серотонин были предложены в качестве возможных специфических метаболитов, которые активируют мышечный метаборефлекс [23]. Эти метаболические стимулы, вызванные сокращением дыхательных мышц, активируют молекулярные рецепторы, расположенные на терминальном конце немиелинизированных нервных волокон, таких как волокна группы IV, которые в основном являются метабочувствительными. Следовательно, спонтанный разряд афферентных мышечных волокон проецируется через входной задний корешок спинного мозга и распространяется на задние рога различных сегментов спинного мозга. Входы мышечных волокон достигают различных уровней интеграции. Эти рефлекс, по-видимому, не нуждаются в активности рострального мозга, хотя возможна супраспинальная интеграция. Кроме того, продолговатый мозг считается зоной контроля сердечно-сосудистых реакций при активации механометаборефлексов [24].

При наличии утомления диафрагмальной мускулатуры при резистивном дыхании, избыточная активация дыхательного метаболического рефлекса приводит к дополнительной гиперактивации симпатoadренальной системы и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, так как увеличение кровотока к диафрагме за счет увеличения сердечного выброса невозможно или недостаточно. Активация симпатoadренальной и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы изменяет влияние Nrf2 на экспрессию антиоксидантных генов. В базовых условиях, в дополнение к комплексу Keap-1/Nrf2, активация антиоксидантных генов также регулируется через ARE транскрипционным репрессором Bach1 [9]. Bach1 конкурирует с Nrf2 в регуляции ARE. Из-за наличия у энхансера ARE сайтов связывания с продуктами метаболизма ангиотензина-2 на разных антиоксидантных генах, динамическое взаимодействие между Bach1 и Nrf2 может вызывать различную регуляторную экспрессию [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резистивные нагрузки 40%P_{max} и 60%P_{max} не изменяли экспрессию генов Cu/Zn-SOD и GPX1 относительно исходного донагрузочного значения. Таким образом, лейкоцитарная Nrf2 в условиях окислительного стресса, индуцированного ДПС, не обеспечивает экспрессию генов антиоксидантной защиты. Предполагается, что избыточная работа дыхательной мускулатуры формирует метаболический рефлекс со стороны дыхательных мышц, запускающий окислительный стресс и воспаление на уровне скелетной мускулатуры.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hasanuzzaman M., Bhuyan M., Zulfiqar F., et al. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*. 2020;9:681. doi:10.3390/antiox9080681.
2. Sun Y., Lu Y., Saredy J., et al. ROS systems are a new integrated network for sensing homeostasis and alarming stresses in organelle metabolic processes. *Redox Biology*. 2020;37:101696. doi:10.1016/j.redox.2020.101696.
3. Sidhaye V. K., Holbrook J. T., Burke A., Sudini K. R., et al. Compartmentalization of antioxidant and antiinflammatory gene expression in current and former smokers with COPD. *Respir. Res.* 2019;20:190. doi:10.1186/s12931-019-1164-1.
4. Fratta Pasini A. M., Ferrari M., Stranieri C., Vallerio P., et al. Nrf2 expression is increased

in peripheral blood mononuclear cells derived from mild-moderate ex-smoker COPD patients with persistent oxidative stress. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2016;11:1733-1743. doi:10.2147/COPD.S102218.

5. Fratta Pasini A. M., Stranieri C., Ferrari M., Garbin U., et al. Oxidative stress and Nrf2 expression in peripheral blood mononuclear cells derived from COPD patients: an observational longitudinal study. *Respir Res.* 2020;21:37 doi:10.1186/s12931-020-1292-7.

6. Goven D., Boutten A., Lecon-Malas V., Marchal-Somme J., et al. Altered Nrf2/Keap1-Bach1 equilibrium in pulmonary emphysema. *Thorax*. 2008;63:916-924. doi:10.1136/thx.2007.091181

7. Congyan L., Jingxin F., Guangtao S., et al. Nrf2 pathway activation promotes the expression of genes related to glutathione metabolism in alcohol-exposed astrocytes. *Peer J.* 2024;31:12:e17541. doi:10.7717/peerj.17541.

8. Russell T. M., Richardson D. R. The good Samaritan glutathione-S-transferase P1: an evolving relationship in nitric oxide metabolism mediated by the direct interactions between multiple effector molecules. *Redox Biology*. 2023;59:1025-68. doi:10.1016/j.redox.2022.102568.

9. Dhar S. K., Scott T., Wang C., Fan T. W. M., Clai D. K. St. Mitochondrial superoxide targets energy metabolism to modulate epigenetic regulation of NRF2-mediated transcription. *Free. Radic. Biol. Med.* 2022;1:181-189. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.309.

10. Li J., Baker J., Higham A., Shah R., et al. COPD lung studies of Nrf2 expression and the effects of Nrf2 activators. *Inflammopharmacology*. 2022;30:1431-1443. doi:10.1007/s10787-022-00967-3.

11. Chen W., Chen X. Y., Wang Y., et al. Mechanism of emulsified isoflurane postconditioning-induced activation of the Nrf2-antioxidant response element signaling pathway during myocardial ischemia-reperfusion: the relationship with reactive oxygen species. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2019;73(5):265-271. doi:10.1097/FJC.0000000000000668.

12. Krajka-Kuzniak V., Paluszczak J., Baer-Dubowska W. The Nrf2-ARE signaling pathway: an update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment. *Pharmacological Reports*. 2017;69(3):393-402. doi:10.1016/j.pharep.2016.12.011.

13. Бяловский Ю. Ю., Ракитина И. С., Аба-ленихина Ю. В., Щулькин А. В. Влияние дополнительного респираторного сопротивления на уровень сигнальных белков HIF-1 α , Nrf2 и NF- κ B у здоровых людей. *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2024;21(5):607-620.

14. Бяловский Ю. Ю., Ракитина И. С., Абаленихина Ю. В., Шулькин А. В. Воспаление и окислительный стресс в условиях дополнительного респираторного сопротивления. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2024;14(2):5-13. doi:10.29039/2224-6444-2024-14-2-5-13.
15. Омельченко В. П., Демидова А. А. Информатика, медицинская информатика, статистика. Москва: Геотар-Медиа. 2021.
16. Asimakos A., Toumpanakis D., Karatza M. H., Vasileiou S., et al. Immune cell response to strenuous resistive breathing: comparison with whole body exercise and the effects of antioxidants. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2018;13:529-545. doi:10.2147/COPD.S154533.
17. Borg G. A. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 1982;14:377-381. doi:10.1249/00005768-198205000-00012.
18. Ланкин В.З., Гуревич С.М. Ингибирование переокисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатион-редуктазы) при экспериментальном злокачественном росте. *ДАН СССР*. 1976; 226 (3):705 – 708.
19. Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопр. мед. химии*. 1990;36(2):88-91.
20. Abed D. A., Goldstein M., Albanyan H., Jin H., Hu L. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. *Acta Pharm. Sin.* 2015;5:285-299. doi:10.1016/j.apsb.2015.05.008.
21. Harms C. A., Babcock M. A., McClaran S. R., et al. Respiratory muscle work compromises leg blood flow during maximal exercise. *Journal of Applied Physiology*. 1997;82:1573-1583. doi:10.1152/jappl.1997.82.5.1573.
22. Grotle A. K., Macefield V. G., Farquhar W. B., et al. Recent advances in exercise pressor reflex function in health and disease. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2020;228:102698. doi:10.1016/j.autneu.2020.102698
23. Smith J. R. Inspiratory muscle weakness in cardiovascular diseases: Implications for cardiac rehabilitation. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2022;70:49-57. doi: 10.1016/j.pcad.2021.10.002
24. Asimakos A., Toumpanakis D., Karatza M. H., et al. Immune cell response to strenuous resistive breathing: comparison with whole body exercise and the effects of antioxidants. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2018;13:529-545. doi: 10.2147/COPD.S154533
25. Congyan L., Jingxin F., Guangtao S., et al. Nrf2 pathway activation promotes the expression of genes related to glutathione metabolism in alcohol-exposed astrocytes. *Peer J*. 2024;31:12:e17541. doi:10.7717/peerj.17541.

REFERENCES

1. Hasanuzzaman M., Bhuyan M., Zulfqar F., et al. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*. 2020;9:681. doi:10.3390/antiox9080681.
2. Sun Y., Lu Y., Saredy J., et al. ROS systems are a new integrated network for sensing homeostasis and alarming stresses in organelle metabolic processes. *Redox Biology*. 2020;37:101696. doi:10.1016/j.redox.2020.101696.
3. Sidhaye V. K., Holbrook J. T., Burke A., Sudini K. R., et al. Compartmentalization of antioxidant and antiinflammatory gene expression in current and former smokers with COPD. *Respir. Res.* 2019;20:190. doi:10.1186/s12931-019-1164-1.
4. Fratta Pasini A. M., Ferrari M., Stranieri C., Vallerio P., et al. Nrf2 expression is increased in peripheral blood mononuclear cells derived from mild-moderate ex-smoker COPD patients with persistent oxidative stress. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2016;11:1733-1743. doi:10.2147/COPD.S102218.
5. Fratta Pasini A. M., Stranieri C., Ferrari M., Garbin U., et al. Oxidative stress and Nrf2 expression in peripheral blood mononuclear cells derived from COPD patients: an observational longitudinal study. *Respir Res.* 2020;21:37 doi: 10.1186/s12931-020-1292-7.
6. Goven D., Boutten A., Lecon-Malas V., Marchal-Somme J., et al. Altered Nrf2/Keap1-Bach1 equilibrium in pulmonary emphysema. *Thorax*. 2008;63:916-924. doi: 10.1136/thx.2007.091181
7. Congyan L., Jingxin F., Guangtao S., et al. Nrf2 pathway activation promotes the expression of genes related to glutathione metabolism in alcohol-exposed astrocytes. *Peer J*. 2024;31:12:e17541. doi:10.7717/peerj.17541.
8. Russell T. M., Richardson D. R. The good Samaritan glutathione-S-transferase P1: an evolving relationship in nitric oxide metabolism mediated by the direct interactions between multiple effector molecules. *Redox Biology*. 2023;59:1025-68. doi:10.1016/j.redox.2022.102568.
9. Dhar S. K., Scott T., Wang C., Fan T. W. M., Clai D. K. St. Mitochondrial superoxide targets energy metabolism to modulate epigenetic regulation of NRF2-mediated transcription. *Free. Radic. Biol. Med.* 2022;1:181-189. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.309.

10. Li J., Baker J., Higham A., Shah R., et al. COPD lung studies of Nrf2 expression and the effects of Nrf2 activators. *Inflammopharmacology*. 2022;30:1431-1443. doi:10.1007/s10787-022-00967-3.
11. Chen W., Chen X. Y., Wang Y., et al. Mechanism of emulsified isoflurane postconditioning-induced activation of the Nrf2-antioxidant response element signaling pathway during myocardial ischemia-reperfusion: the relationship with reactive oxygen species. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2019;73(5):265-271. doi:10.1097/FJC.0000000000000668.
12. Krajka-Kuzniak V., Paluszczak J., Baer-Dubowska W. The Nrf2-ARE signaling pathway: an update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment. *Pharmacological Reports*. 2017;69(3):393-402. doi:10.1016/j.pharep.2016.12.011.
13. Byalovsky Yu. Yu., Rakitina I. S., Abalenikhina Yu. V., Shchulkin A. V. The influence of additional respiratory resistance on the level of signaling proteins HIF-1 α , Nrf2 and NF- κ b in healthy people. *Bulletin of the Ural Medical Academic Science*. 2024;21(5):607-620. (In Russ.).
14. Byalovsky Yu. Yu., Rakitina I. S., Abalenikhina Yu. V., Shchulkin A. V. Inflammation and oxidative stress under conditions of additional respiratory resistance. *Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2024;14(2):5-13. (In Russ.). doi:10.29039/2224-6444-2024-14-2-5-13.
15. Omelchenko V. P., Demidova A. A. Informatics, medical informatics, statistics. Moscow: Geotar-Media. 2021;608. (In Russ.).
16. Asimakos A., Toumpanakis D., Karatza M. H., Vasileiou S., et al. Immune cell response to strenuous resistive breathing: comparison with whole body exercise and the effects of antioxidants. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis*. 2018;13:529–545. doi:10.2147/COPD.S154533.
17. Borg G. A. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med. Sci. Sports. Exerc*. 1982;14:377-381. doi:10.1249/00005768-198205000-00012.
18. Lankin V.Z., Gurevich S.M. Inhibition of lipid peroxidation and detoxification of lipid peroxides by protective enzymatic systems (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase) during experimental malignant growth. *DAN SSSR*. 1976; 226 (3):705-708. (In Russ.).
19. Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Kovaleva Zh. V. A simple and sensitive method for determining superoxide dismutase activity based on the oxidation reaction of quercetin. *Voprosy medicinskoj himii*. 1990;36(2):88-91. (In Russ.).
20. Abed D.A., Goldstein M., Albanyan H., Jin H., Hu L. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. *Acta Pharm. Sin*. 2015;5:285–299. doi:10.1016/j.apsb.2015.05.008.
21. Harms C. A., Babcock M. A., McClaran S. R., et al. Respiratory muscle work compromises leg blood flow during maximal exercise. *Journal of Applied Physiology*. 1997;82:1573-1583. doi:10.1152/jappl.1997.82.5.1573.
22. Grotle A. K., Macefield V. G., Farquhar W. B., et al. Recent advances in exercise pressor reflex function in health and disease. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2020;228:102698. doi:10.1016/j.autneu.2020.102698
23. Smith J. R. Inspiratory muscle weakness in cardiovascular diseases: Implications for cardiac rehabilitation. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2022;70:49-57. doi:10.1016/j.pcad.2021.10.002
24. Asimakos A., Toumpanakis D., Karatza M. H., et al. Immune cell response to strenuous resistive breathing: comparison with whole body exercise and the effects of antioxidants. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2018;13:529-545. doi: 10.2147/COPD.S154533
25. Congyan L., Jingxin F., Guangtao S., et al. Nrf2 pathway activation promotes the expression of genes related to glutathione metabolism in alcohol-exposed astrocytes. *Peer J*. 2024;31:12:e17541. doi: 10.7717/peerj.17541.