



Анализ профиля экспрессии генов NOS2, PDE5A и HIF-1 α методом цифровой капельной ПЦР

В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, Р.А. Агельдинов, Н.В. Петрова,
Ю.В. Фокин, Д.В. Хвостов

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: Дуля Максим Сергеевич, mduliya@gmail.com;
Агельдинов Руслан Андреевич, ageldinov@gmail.com

Исследовано влияние продукта выделения мускусных желез кабарги *Moschus moschiferus* путем определения уровней экспрессии генов молекул субъединицы 1 α гипоксией индуцибельного фактора, индуцибельной изоформы синтазы оксида азота и циклического гуанозинмонофосфата – специфической фосфодиэстеразы типа 5A у экспериментальных животных в условиях стресса, вызванного физической нагрузкой. В работе были исследованы биологические материалы (мозг, сердце и легкие) крыс Wistar, получавших изучаемое вещество и подвергавшихся тесту вынужденного плавания с грузом. Профиль экспрессии генов определялся методом цифровой капельной полимеразной цепной реакции. На фоне введения тестируемых веществ уровни экспрессии изучаемых генов характеризуются ожидаемыми значениями, что демонстрирует ускоренный запуск многофакторных механизмов адаптации организма и усиливает способность тканей переживать неблагоприятные условия при введении активных компонентов мускусных желез кабарги *Moschus moschiferus*.

Ключевые слова: кабарга сибирская *Moschus moschiferus*, мускус, цифровая капельная полимерная цепная реакция, субъединица 1 α гипоксией индуцибельного фактора, индуцибельная синтаза оксида азота, циклический гуанозинмонофосфат – специфическая фосфодиэстераза типа 5A, экспрессия.

Введение

Живые организмы на протяжении всей жизни взаимодействуют с окружающей средой и обеспечивают своё выживание в ней, проявляя стабильность к различного рода изменениям путем адаптации. Адаптация, как известно, – динамический процесс, включающий в себя мониторинг отклонений от нормы, а также проявление надлежащего ответа для корректировки влияния стрессирующего фактора [1]. Наиболее

существенной, с точки зрения решения повседневных проблем, является физиологическая адаптация, т.к. она демонстрирует ответную реакцию организма на повседневные трудности в течение всей жизни путем поддержания энергетической результативности и установлением оптимального пути для возвращения организма в динамическое равновесие [5]. В исследовательских работах физиологическая адаптация подвергается анализу как стратегия, при

которой различные параметры биологической системы восстанавливаются до значений, предшествующих влиянию, оказанному на изучаемый организм [2]. Адаптацию, как адаптационный ответ, можно постигать на всевозможных уровнях организации жизни (клетка, орган, организм и т.д.). В представленной работе изучено влияние внешних и внутренних факторов на внутриклеточный уровень организации организма. Стоит уделить большой интерес фактору стремительности возвращения к равновесию как одному из наиболее значимых в данном вопросе.

Эволюция позвоночных требовала новых стратегий для обеспечения адекватной доставки молекулярного кислорода и метаболитических субстратов ко всем клеткам. Одним из решений представленной проблемы было формирование системы кровообращения, состоящей из трех основных компонентов:

- «транспортного средства» для транспортировки O₂ (эритроцит);
- системы «шоссе», по которой «транспортное средство» было бы способно перемещаться во все потенциальные места назначения (сосудистая сеть);
- «двигательной силовой установки» (сердце).

Данная уникальная физиологическая система обеспечивает механизм, снабжающий каждую клетку организма необходимым количеством кислорода и глюкозы для полного удовлетворения ее метаболитических потребностей. Существует также и прямая связь между адаптационными процессами и модификациями, происходящими в сердечно-сосудистой сети, где роль связующего между ними элемента выполняет стресс [8]. Как известно, сердечно-со-

судистая система является одной из важнейших структур у высших организмов. Она объединяет все органы и ткани организма, обеспечивая циркуляцию крови в них. Помимо этого, она способствует поддержанию гомеостаза в динамических условиях окружающей среды. Одним из наиболее существенных для нее факторов является стресс. А одной из значимых систем при стрессе является гуморальная система, влияние которой активно распространяется по всему организму путем циркуляции по сердечно-сосудистой системе. Стресс может быть определен как субъективное восприятие неблагоприятных трансформаций окружающей среды, которые, как правило, приводят к стрессовой реакции, позволяющей адаптироваться к новым условиям жизни. Многообразные стрессовые факторы – в частности, физиологического характера – способны стимулировать активный биохимический отклик, распространяющийся по сердечно-сосудистой системе, проявляя таким образом воздействие на функции многих органов [8].

В проведенном исследовании показателями динамики стабилизации нормальных значений для адаптации к стрессовым условиям были избраны следующие молекулы генов:

гипоксией индуцируемый фактор 1 (HIF-1) является транскрипционным и гетеродимерным фактором, важнейшая функция которого выражается в адаптивном отклике на дефицит кислорода в клетках млекопитающих. Молекула HIF-1 объединяет в себе две макромолекулы, субъединицы 1 α и 1 β (HIF-1 α и HIF-1 β , соответственно). Основная макромолекула накапливается при гипоксических

условиях, и ее экспрессия жёстко регулируется концентрацией клеточного кислорода, в то время как вторая – конститутивно экспрессируется и служит в роли гетеродимеризационного партнера для нескольких других факторов транскрипции. HIF-1 α непрерывно деградирует в нормоксических условиях с помощью убиквитин-протеасомной системы. Возвращение HIF-1 α к исходным величинам может быть вызвано благополучным восстановлением интенсивности кислорода в ткани [6, 14].

Ген HIF-1 α кодирует макромолекулу, которая [18]:

- проявляет себя через связывание с белковыми комплексами; белковую гетеродимеризационную активность; связывание с последовательностью ДНК и т.д.;
- участвует в процессах острого фазового ответа; клеточного ответа на монооксид углерода и ион кобальта; участвует в пути индуцируемого гипоксией факторов; сигнальном пути фактора роста эндотелия сосудов; mTOR сигнальном пути; артериальном тромбозе и т.д.;
- локализуется в цитоплазме, ядре, цитозоле.

Многие исследования HIF-1 подтверждают то, что данный транскрипционный фактор играет значимую роль в физиологии сердечно-сосудистой системы.

Следующим объектом изучения стал полипептид синтазы оксида азота (NOS). Впервые NOS был описан в качестве эндотелиального релаксирующего фактора, в дальнейшем – стал основным сигнальным устройством, регулирующим практически каждую критическую клеточную функцию, а также мощным медиатором клеточного повреждения в широком диапазоне

условий [10]. Мозг оказался первым богатым источником синтезируемой молекулы NO, что способствовало открытию первой NO-синтазы (нейронная NOS, nNOS или NOS1). Следующая молекула NOS была выделена из макрофагов и известна как **NOS2, или iNOS (индуцибельная NOS)**, потому что она без труда индуцируется во многих тканях с помощью проникающих цитокинов. Последней идентифицированной синтазой представленного типа стала эндотелиальная NO-синтаза, которая известна также как eNOS, или NOS3 [13].

Продукт указанных синтаз – оксид азота. Он представляет собой молекулу «посланника» макрофагов с широким спектром функций во всем организме. Например, в мозге и периферической нервной системе представленное производное играет роль нейромедиатора, данная молекула также косвенно связана с регуляцией гладких мышц, охватывая перистальтику и эрекцию полового члена, также связана с модулированием кровотока и тромбоза. Важнейшим отличием молекулы NOS2 от прочих NOS является то, что ее активность не регулируется изменениями внутриклеточного содержания кальция, и белок может временно индуцироваться при нормальных величинах Ca²⁺, достаточных для полной активации NOS2. iNOS является биологическим демпфером, который проявляется в тканях-мишенях через действия цГМФ, устанавливая уровень реакции на стресс. NOS также выполняет множество существенных физиологических ролей в регуляции функции сердца, охватывая коронарную вазодилатацию, ингибирование тромбоцитов, адгезию

и активацию нейтрофилов, модуляцию сердечной сократительной функции и ингибирующего потребления кислорода сердцем [12].

Ген NOS2 кодирует белок, который [17]:

- проявляется через связывание с актином, β -катенином, кадгерином;
- описан в процессах старения, реконструкции кровеносного сосуда, клеточном ответе на стимул цитокинов;
- участвует в пути передачи сигналов эндотелина, гипоксического индукцибельного фактора, сигнальном пути интерлейкина-12;
- обнаружен в цитоплазме, цитозоле, внеклеточном пространстве.

Циклический гуанозинмонофосфат – специфическая фосфодиэстераза типа 5 (PDE5A) представляет собой фермент из класса фосфодиэстераз. Он встречается в различных тканях, интенсивнее всего наблюдается в сердце, пещеристом теле и сетчатке. Недавно было установлено, что он играет существенную роль в работе сердечно-сосудистой системы. PDE5 представляет собой фермент, который приводит к деградации молекулы цГМФ [7, 15, 16].

Было продемонстрировано, что связывание цГМФ с GAF-A доменом полипептида PDE5A стимулирует ферментативную каталитическую активность примерно в 10 раз, а его блокада, соответственно, ингибирует активность. На основании этого предполагается, что фермент в большинстве своем неактивен в отсутствие связывания с лигандом. Однако, учитывая высокое сродство сайта GAF-A с цГМФ, предполагается, что при нормальных физиологических условиях данный домен будет взаимодей-

ствовать с лигандом, что, в свою очередь, будет способствовать проявлению его специфической активности.

Ингибирование PDE5A демонстрирует положительные эффект при повреждении сердца. Излишняя экспрессия данной молекулы способствует ухудшению патологического ремоделирования после того, как мышечные кардиомиоциты испытали инфаркт миокарда. Роль PDE5A в сердечной недостаточности и ее терапии с участием соответствующих ингибиторов были существенными сферами интересов как для лабораторных, так и для клинических исследований. Было продемонстрировано, что специфические ингибиторы PDE5A (силденафил, вardenafil, тадалафил и т.д.) улучшают характеристики памяти и/или усиливают синаптическую пластичность и когнитивную функцию на различных моделях животных [9, 11]. Доказано, что угнетение PDE5A ингибирует рост раковых клеток.

Ген PDE5A кодирует белок, который [19]:

- проявляет себя как 3', 5'-циклическая-ГМФ фосфодиэстераза; 3', 5'-циклически-нуклеотидная фосфодиэстераза;
- участвует в развитии нервной системы, положительной регуляции апоптотического процесса, позитивном регулировании хронического воспалительного ответа, пуриновом метаболическом пути;
- экспериментально изучается при эректильной дисфункции, потере слуха;
- обнаружен в цитозоле.

Мускус кабарги *Moschus moschiferus* в широком смысле давно известен во многих странах как природный био-

стимулятор, являющийся основой народных медицинских лекарственных средств. Ему приписывают обширный спектр действия: иммуностимулирующее, регенерационное, противовоспалительное, нейропротекторное, ноотропное, психоэнергизирующее, противоопухолевое. На сегодняшний день доказано влияние на произвольные мышечные сокращения, анальгезирующее и противовоспалительное действия. Согласно последним проведенным исследованиям он способен проявлять антиоксидантные эффекты, чем зарекомендовал себя как потенциальный препарат для профилактики и лечения нейродегенеративных, сердечно-сосудистых заболеваний, болезней дыхательной системы и т.д.

Ранее нами было установлено, что в мускусе кабарги содержится более 20-ти различных химических соединений, среди которых значительную долю составляют простые липиды (17-38%), стероидные гормоны (38-47%) и производные андростана (10-20%). Исследования демонстрируют, что наибольшая эффективность влияния мускуса проявляется при введении животным его активных компонентов [3].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния продукта выделения мускусных желез кабарги путем определения уровней экспрес-

сии генов молекул субъединицы 1 α гипоксией индуцибельного фактора, индуцибельной изоформы синтазы оксида азота и циклического гуанозинмонофосфата – специфической фосфодиэстеразы типа 5А у экспериментальных животных в условиях стресса, вызванного физической нагрузкой, методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR).

Материалы и методы

Объекты исследования и дизайн эксперимента

Исследование проводили на 15-ти белых крысах Wistar обоего пола массой 200-300 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и прошедших 14-дневный карантин. Животных разделили на 5 групп в зависимости от способа введения и вводимого вещества (табл. 1). Условия работы с экспериментальными животными соответствовали Приказу Минздрава России № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и директиве ЕС от 22.09.2010 «По охране животных, используемых в научных целях».

Животные содержались по 6 особей в клетках «Rair Iso System» при температуре воздуха 20-22°C и относительной влажности воздуха 40-60%, световом режиме 12/12, на стандартном комбикорме со свободным доступом к пище

Таблица 1

Дизайн эксперимента

Номер группы	Условия эксперимента (вводимые субстанции, способ введения)
1-2	Активные компоненты мускуса, внутрижелудочно
3-4	Очищенная вода, внутрижелудочно
5	Активные компоненты мускуса, ректально

и водопроводной очищенной воде. Депривация корма осуществлялась за 2 ч до начала теста.

Стрессовые условия создавались с использованием методики «**Вынужденное плавание с грузом**» [4], представляющей собой комбинированный жесткий вид стресса, сочетающий физический и эмоциональный компоненты. Плавание крыс осуществляли с грузом 10% от массы тела, прикрепленным резиновой лигатурой к кончику хвоста животного. Предварительно массу животных определяли взвешиванием с точностью до 1 г. Моментом окончания эксперимента считали утомление – неспособность всплыть на поверхность воды или погружение на дно более чем на 10 с. Тест проводили в сосудах из оргстекла с внутренним диаметром 30 см и высотой 75 см. Высота столба воды равнялась 60 см, температура воды составляла $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Постановку теста проводили в утренние часы. Предварительно животным вводили мускус кабарги (согласно схеме, табл. 1). В течение 20 мин после проведения теста животных подвергали эктаназии с помощью эфирного наркоза и осуществляли забор внутренних органов (мозг, легкие и сердце) для последующего анализа. Органы помещали в морозильную камеру до следующего этапа.

Гомогенизация и выделение РНК

Отбирали ткани органов массой 0,1-0,2 г в пробирки объемом 1,5 мл. Далее добавляли 1 мл натрий-фосфатного буфера (pH=7,4) для гомогенизации на механическом гомогенизаторе. После каждой пробы гомогенизатор прочищали и промывали водой и спиртовым р-ром для исключения побоч-

ных контаминаций. Гомогенизированные пробы центрифугировали в течение 5 мин на 13 тыс. об./мин и отбирали в пробирки надосадочную жидкость в объеме 100 мкл. Далее в отобранные аликвоты добавляли реагенты из набора РИБО-сорб («ИнтерЛабСервис», Россия), согласно инструкции. В результате всех манипуляций из каждой пробы получали супернатант, содержащий смесь ДНК и РНК. Все стадии проводили на льду.

Обратная транскрипция на матрице РНК

Полученную ранее надосадочную жидкость из каждой пробы подвергали процессу обратной транскрипции. Данную процедуру проводили с помощью набора реагентов РИВЕРТА-L («ИнтерЛабСервис», Россия) и согласно приложенной к нему инструкции. В результате получили пробы по 20 мкл, содержащие кДНК в ДНК-буфере. Все манипуляции проводили на льду. Готовые пробы кДНК заморозили при температуре не выше -68°C .

Подбор пар «праймеры-зонд»

До постановки теста вынужденного плавания были подобраны системы праймеров и зондов на представленные гены, за исключением HIF-1 α , на который они уже были получены нами в НЦБМТ ФМБА России ранее. С помощью базы данных NCBI были получены данные об изучаемых генах. В программе «Beacon Designer 7» были подобраны праймеры и зонды, с предварительными анализами в «Ensembl» (для выявления участков шивки экзонов), «BioGPS» (для определения наиболее значимых для анализа тканей), с проверкой полученных систем через «Blast NCBI» (на специфичность подобранных пар). По-

Таблица 2

Праймеры и зонды для ddPCR

Исследуемая мишень	Олигонуклеотидные праймеры и зонды, 5'-3' последовательность	
NOS2	Прямой праймер Обратный праймер Флуоресцентный зонд	GGAACAGTATAAGGCAAAC CAGAGATTTCTTCAGAGTC FAM-CCTTGGAAGAGGAACAACACTACTGCT-BHQ1
PDE5a	Прямой праймер Обратный праймер Флуоресцентный зонд	TGGAGAACAAAAGAAATCA GAAGGAGATAATAGTGGC FAM-TTACTTCCAATGACTGCTGCTCCT-BHQ1

сле аналитического анализа и проверки данные системы были заказаны в фирме “ДНК-синтез” (Россия) (табл. 2).

Постановка цифровой капельной ПЦР

Полученные ранее пробы, содержащие кДНК, были исследованы методом цифровой капельной ПЦР. Амплифи-

кацию с последующим определением уровней экспрессии изучаемых генов проводили с помощью термоциклера C1000 touch и ридера капель QX200 (табл. 3).

Подготовка образцов для ПЦР – соединение исследуемых образцов нуклеиновой кислоты (кДНК), праймеров и

Таблица 3

Состав реакционной смеси для ПЦР и условия амплификации

Состав смеси для ПЦР				
Компонент	Объем на реакцию, мкл	Финальная концентрация		
2x ddPCR Supermix for Probes	10	1x		
20x праймеры и зонд	2	900 nM / 250 Nm		
Анализируемый образец	Вариабельно	до 300 Nm		
Очищенная вода	Вариабельно	-		
Итоговый объем	20	-		
Условия амплификации				
Шаг	Температура, °C	Период	Скорость изменения температуры	Число циклов
Активация энзима	95	10 мин	2°C в сек	1
Денатурация	94	30 с		40
Отжиг	55-65*	1 мин		40
Деактивация энзима	98	10 мин		1
Задержка	4	∞		1

Примечания: * – вариабельный диапазон, зависящий от подобранных праймеров.

зондов (FAM) с супермиксом Bio-Rad для ddPCR, в соответствии с инструкцией, прилагаемой к супермиксу (табл. 3).

Создание капель – загрузка 20 мкл реакции ddPCR в контейнер генератора капель DG8, далее – загрузка контейнера в генератор капель QX200 для разделения образца на капли нанолитрового объема, требуемых для анализа ddPCR.

Проведение ПЦР: капли из контейнера с помощью дозатора помещаются в 96-луночный планшет для ПЦР, который запечатывается с помощью приспособления для заклеивания планшетов PX1.

Считывание капель – загрузка планшета в ридер капель QX200 и запуск программы «QuantaSoft».

Анализ результатов: ридер капель подключается к ноутбуку с запущенным

программным обеспечением «QuantaSoft». Программное обеспечение определяет «положительные» и «отрицательные» капли в каждом образце и представляет в графическом виде по капельное изменение флуоресценции: доля положительных капель в образце определяет концентрацию мишени в копиях/мкл.

После получения массива данных был проведен оценочный анализ результатов с использованием вышеуказанной программы, а полученные в ней данные были конвертированы для последующего анализа в программе Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

Были получены следующие данные (рис. 1-3):

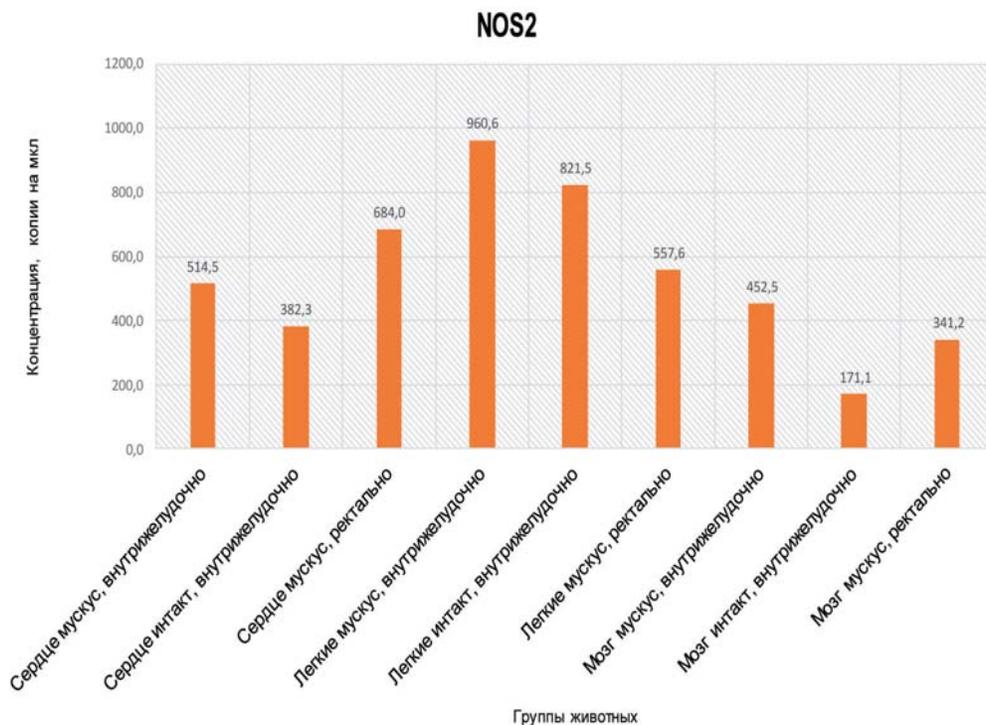


Рис. 1. Результаты анализа экспрессии по гену NOS2.

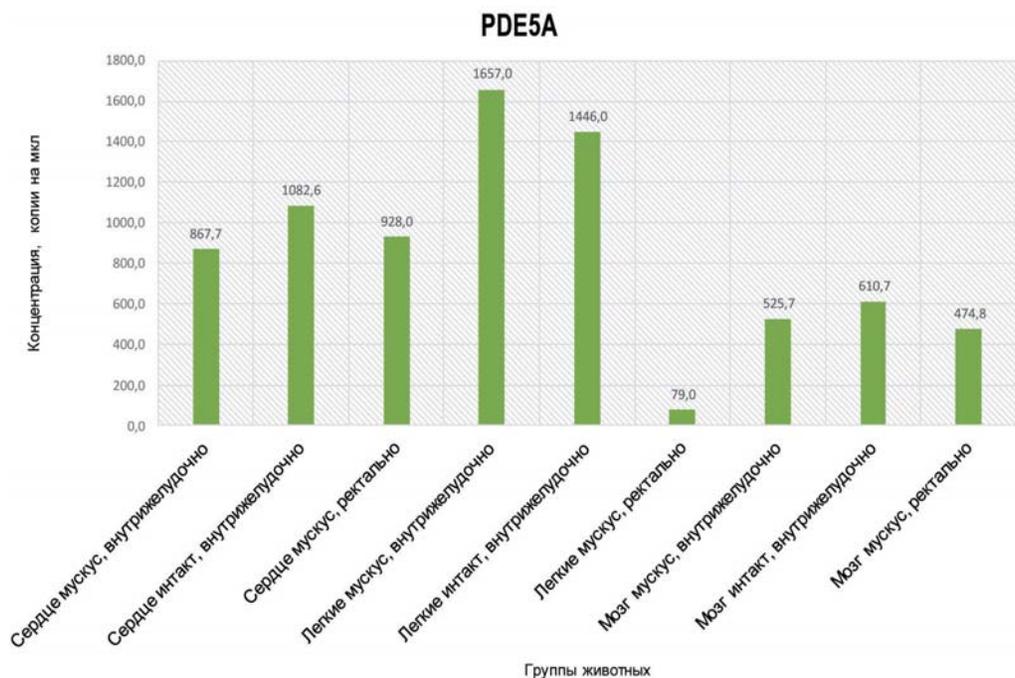


Рис. 2. Результаты анализа экспрессии по гену PDE5A.

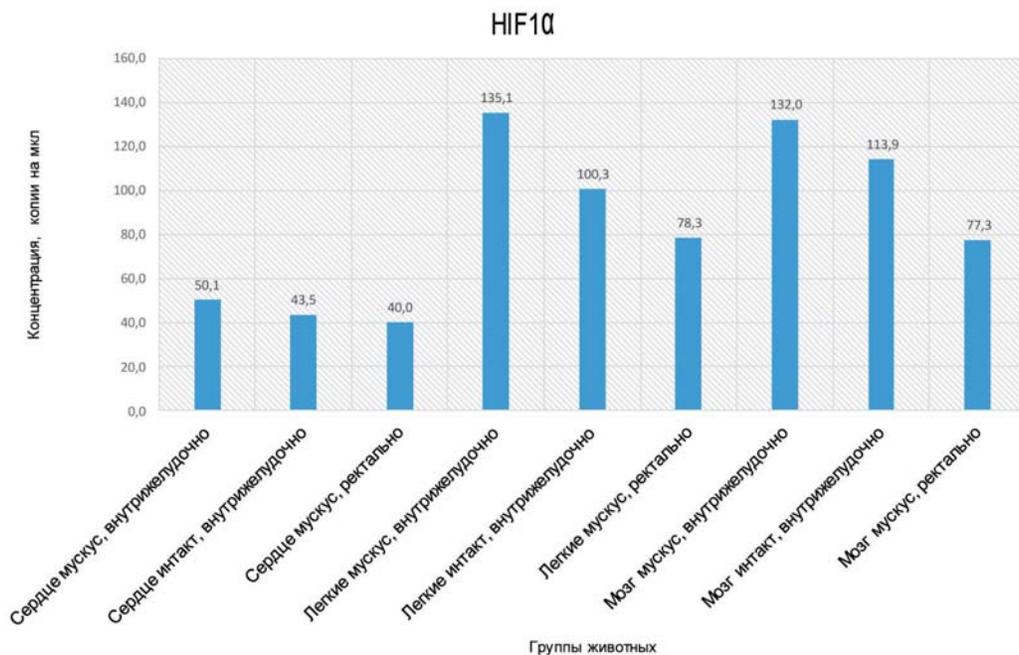


Рис. 3. Результаты анализа экспрессии по гену HIF-1α.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что:

1. Активные компоненты мускуса лучше проявляются при внутрижелудочном способе введения, ректальное введение демонстрирует более слабый эффект.

2. Уровень экспрессии PDE5A понижается в сердце и мозге, в то время как в легких наблюдается противоположный эффект, но только при внутрижелудочном введении.

3. Уровень экспрессии NOS2 повышается во всех представленных тканях. В тканях мозга уровень экспрессии возрастает по сравнению с интактными образцами. При ректальном введении в легких наблюдается противоположная зависимость.

4. Уровень экспрессии HIF-1 α повышается в тканях более стабильно, без резких проявлений. При внутрижелудочном введении отмечается повышение уровня экспрессии, в то время как при ректальном – противоположная картина.

5. В легких и сердце наблюдается наибольший уровень экспрессии генов PDE5A и NOS2. В мозге и легких похожая картина наблюдается у третьего исследуемого гена – HIF-1 α .

Сравнение методик двух поколений ПЦР-анализа позволяет говорить о том, что система ddPCR, в отличие от real-time PCR, обладает рядом преимуществ:

1) возможность анализа профиля экспрессии гена без использования гена-стандарта;

2) мгновенный подсчет образовавшихся копий на 1 мкл реакции;

3) стабильность ПЦР, связанная с минимизацией контаминации при сборке смеси, использованием уже готового

для постановки микса, а также наличие множества капель исключает возможность получения ошибочных результатов;

4) практически полная автоматизация процессов анализа полученных данных;

5) крайне высокая точность анализа, опирающаяся на положительные и отрицательные результаты от каждой капли из в среднем 20000 шт. и на алгоритм подсчета, заложенный в прилагаемое программное обеспечение.

Выводы

1. Наиболее выраженное положительное влияние мускуса кабарги отмечается при внутрижелудочном введении.

2. Статистически более стабильная картина анализа наблюдается по генам NOS2 и HIF-1 α .

3. Проанализированные ткани одинаково хорошо демонстрируют экспрессию генов.

4. Изучаемое вещество ускоряет адаптацию организма в среднем на 37% по сравнению с интактными образцами.

5. Понижение уровня экспрессии PDE5A свидетельствует о расширении сосудов и прочих подобных эффектах, демонстрируемых ингибиторами данной белковой молекулы.

6. Повышение уровня экспрессии NOS2 демонстрирует ускорение процессов взаимодействия между клетками, способствующих физиологическому восстановлению организма.

7. Повышение уровня экспрессии HIF-1 α показывает ускоренную способность организма использовать встроенные механизмы адаптации.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что:

- активные компоненты мускуса кабарги *Moschus moschiferus* способствуют увеличению скорости адаптации животных (крыс) к стрессовым условиям при физических нагрузках;
- профиль экспрессии генов соответствует предполагаемым уровням, при которых увеличивается способность к перенесению неблагоприятных условий.

Список литературы

1. Агаджанян Н.А., Труханов А.И., Шендеров Б.А. Этюды об адаптации и путях сохранения здоровья. – М.: Изд-во «Сирин». – 2002. – 156 с.
2. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. – Ростов н/Д: Изд. РГУ. – 1990. – 224 с.
3. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л. Анализ биологически активных соединений мускуса кабарги (*Moschus moschiferus*) методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором // Биомедицина. – 2018. – № 1. – С. 19-39.
4. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Берзин И.А., Фокин Ю.В., Алимкина О.В. Особенности интерпретации показателей работоспособности лабораторных животных по плавательным тестам с нагрузкой // Биомедицина. – 2016. – № 4. – С. 34-46.
5. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1 α как критерий развития гипоксии тканей // Биомедицина. – 2015. – № 4. – С. 4-15.
6. Chávez J.C., Agani F., Pichiule P., LaManana J.C. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in the brain of rats during chronic hypoxia // J. Appl. Physiol. – 2000. – No. 89(5). – Pp. 1937-1942.
7. Fertel R., Weiss B. Properties and drug responsiveness of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat lung (abstract) // Mol. Pharmacol. – 1976. – No. 12(4). – Pp. 678-687.
8. Garg A., Xu D., Laurin A., Blaber A.P. Physiological interdependence of the cardiovascular and postural control systems under orthostatic stress // Am. J. of physiology. – 2014. – Vol. 307. – No. 2. – Pp. 259-264.
9. Li-Yun Z., Yao Z., Yu-Ren J., Xiong-Jie Z., Dong G. Design, synthesis and biological evaluation of dual acetylcholinesterase and phosphodiesterase 5A inhibitors in treatment for Alzheimer's disease // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2017. – No. 27(17). – Pp. 4180-4184.
10. Lowenstein C.J., Glatt C.S., Bredt D.S., Snyder S.H. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1992. – No. 89(15). – Pp. 6711-6715.
11. Nardoza A., Cabrini M.R. Daily use of phosphodiesterase type 5 inhibitors as prevention for recurrent priapism // Rev. Assoc. Med. Bras. – 2017. – No. 63(8). – Pp. 689-692.
12. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite: in Health and disease // Physiological Reviews. – 2007. – No. 87(1). – Pp. 315-424.
13. Porasuphatana S., Weaver J., Rosen G.M. Inducible nitric oxide synthase catalyzes ethanol oxidation to alpha-hydroxyethyl radical and acetaldehyde // Toxicology. – 2006. – No. 223. – Pp. 167-174.
14. Semenza G.L., Agani F., Iyer N., Kotch L., Laughner E., Leung S., Yu A. Regulation of cardiovascular development and physiology by hypoxia-inducible factor 1 // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1999. – No. 874. – Pp. 262-268.
15. Uzunov P., Weiss B. Separation of multiple molecular forms of cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate phosphodiesterase in rat cerebellum by polyacrylamide gel electrophoresis // Biochim. Biophys. Acta. – 1972. – No. 284(1). – Pp. 220-226.
16. Weiss B. Differential activation and inhibition of the multiple forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase // Adv. Cyclic Nucleotide Res. – 1975. – Vol. 5. – Pp. 195-211.
17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24599>
18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29560>
19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/171115>

References

1. **Agadzhanyan N.A., Trukhanov A.I., Shenderov B.A.** Etyudy ob adaptatsii i putyakh sokhraneniya zdorov'ya [Etudes about the adaptation system and ways of maintaining health]. Moscow: Izd-vo «Sirin». 2002. 156 p. (In Russian).
2. **Garkavi L.Kh., Kvakina E.B., Ukolova M.A.** Adaptatsionnyye reaktsii i rezistentnost' organizma [Adaptation reactions and resistance of the body]. Rostov-on-Don: Izd. RGU. 1990. 224 p. (In Russian).
3. **Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lublinsky S.L.** Analiz biologicheskii aktivnykh soyedineniy muskusa kabargi (*Moschus moschiferus*) metodom gazovoy khromatografii s mass-selektivnym detektorom [Analysis of biologically active musk from *Moschus moschiferus* by gas chromatography with mass-selective detector]. Biomedicine. 2018. No. 1. Pp. 19-39. (In Russian).
4. **Karkischenko V.N., Karkischenko N.N., Shustov E.B., Berzin I.A., Fokin Yu.V., Alimkina O.V.** Osobennosti interpretatsii pokazatelej rabotosposobnosti laboratornykh zhivotnykh po plavatel'nykh testam s nagruzkoj [Features of the interpretation of the performance indicators of laboratory animals in swimming tests with load]. Biomedicine. 2016. No. 4. Pp. 34-46. (In Russian).
5. **Shustov E.B., Karkischenko N.N., Dulya M.S.** Ekspressiya gipoksiya-inducibel'nogo faktora HIF1 α kak kriterij razvitiya gipoksii tkanej [Expression of hypoxia-inducible factor HIF-1 α as a criterion for the development of tissue hypoxia]. Biomedicine. 2015. No. 4. Pp. 4-15. (In Russian).
6. **Chávez J.C., Agani F., Pichiule P., LaManna J.C.** Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in the brain of rats during chronic hypoxia. J. Appl. Physiol. 2000. No. 89(5). Pp. 1937-1942.
7. **Fertel R., Weiss B.** Properties and drug responsiveness of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat lung (abstract). Mol. Pharmacol. 1976. No. 12(4). Pp. 678-687.
8. **Garg A., Xu D., Laurin A., Blaber A.P.** Physiological interdependence of the cardiovascular and postural control systems under orthostatic stress. Am. J. of physiology. 2014. Vol. 307. No. 2. Pp. 259-264.
9. **Li-Yun Z., Yao Z., Yu-Ren J., Xiong-Jie Z., Dong G.** Design, synthesis and biological evaluation of dual acetylcholinesterase and phosphodiesterase 5A inhibitors in treatment for Alzheimer's disease. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. No. 27(17). Pp. 4180-4184.
10. **Lowenstein C.J., Glatt C.S., Bredt D.S., Snyder S.H.** Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1992. No. 89(15). Pp. 6711-6715.
11. **Nardoza A., Cabrini M.R.** Daily use of phosphodiesterase type 5 inhibitors as prevention for recurrent priapism. Rev. Assoc. Med. Bras. 2017. No. 63(8). Pp. 689-692.
12. **Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L.** Nitric Oxide and Peroxynitrite: in Health and disease. Physiological Reviews. 2007. No. 87(1). Pp. 315-424.
13. **Porasuphatana S., Weaver J., Rosen G.M.** Inducible nitric oxide synthase catalyzes ethanol oxidation to alpha-hydroxyethyl radical and acetaldehyde. Toxicology. 2006. No. 223. Pp. 167-174.
14. **Semenza G.L., Agani F., Iyer N., Kotch L., Laughner E., Leung S., Yu A.** Regulation of cardiovascular development and physiology by hypoxia-inducible factor 1. Annals of the New York Academy of Sciences. 1999. No. 874. Pp. 262-268.
15. **Uzunov P., Weiss B.** Separation of multiple molecular forms of cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate phosphodiesterase in rat cerebellum by polyacrylamide gel electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta. 1972. No. 284(1). Pp. 220-226.
16. **Weiss B.** Differential activation and inhibition of the multiple forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 1975. Vol. 5. Pp. 195-211.
17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24599>
18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29560>
19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/171115>

Analysis of the gene expression profile NOS2, PDE5A and HIF-1 α by the digital droplet PCR

V.N. Karkischenko, M.S. Dulya, R.A. Ageldinov, N.V. Petrova, Yu.V. Fokin, D.V. Khvostov

The effect of the release product of the musk glands of *Moschus moschiferus* was determined by determining the expression levels of the molecules of the 1 α subunit of the hypoxia inducible factor, inducible nitric oxide synthase and cyclic guanosine monophosphate -specific phosphodiesterase type 5A in experimental animals under stress caused by forced activity. The biological materials (brain, heart and lungs) of Wistar rats that received the substance under study and undergone a forced swim test with a cargo were examined in the work. The gene expression profile was determined by droplet digital polymerase chain reaction. Against the background of the introduction of test substances, the expression levels of the studied are characterized by the expected values, which demonstrate the accelerated start of multifactorial mechanisms of adaptation of the organism and amplifies the ability of tissues to experience unfavorable conditions upon administration of active components of the musk glands of *Moschus moschiferus*.

Key words: Siberian musk *Moschus moschiferus*, droplet digital polymerase chain reaction, subunit 1 α of the hypoxia inducible factor, inducible nitric oxide synthase, cyclic guanosine monophosphate - specific phosphodiesterase type 5A, expression.