

ИССЛЕДОВАНИЕ И ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *NFE2L2* ПРИ АДАПТАЦИИ К ФИЗИЧЕСКИМ НАГРУЗКАМ У МИНИ-ПИГОВ

В.Н. Каркищенко, Н.В. Петрова*, Н.В. Станкова, В.В. Слободенюк,
О.В. Алимкина, М.И. Кулакова, И.А. Васильева

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»

143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1

В статье показана экспрессия гена *NFE2L2* (Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2) при адаптации к физическим нагрузкам (достижению оксидативного стресса) у мини-пигов. В эксперименте воспроизведены естественные условия оксидативного стресса у лабораторных животных (мини-пигов, 16 особей). Спортивная тренировка является оптимальной и естественной моделью усиленной диссимиляции как причины оксидативного стресса. Результаты исследования свидетельствуют, что ген *NFE2L2*, кодирующий фактор транскрипции Nrf2, активно экспрессируется в ответ на оксидативный стресс в клетках организма животных. Ген *NFE2L2* может служить оценочным критерием при проведении молекулярно-генетических исследований работоспособности и выносливости для индивидуального отбора по группам. Он рекомендован для проведения исследований влияния фармакологических препаратов на восстановительные свойства организма при возможном выборе фармнутриентов и экстраполяции исследований на человека. Важным практическим результатом и показателем адаптации является повышение работоспособности. Возможность повлиять на экспрессию гена *NFE2L2* может усилить способность организма к адаптации в условиях кислородного голодания.

Ключевые слова: оксидативный стресс, адаптация, выносливость, ДНК, ген *NFE2L2*, мини-пиги

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Станкова Н.В., Слободенюк В.В., Алимкина О.В., Кулакова М.И., Васильева И.А. Исследование и оценка молекулярно-генетических признаков экспрессии гена *NFE2L2* при адаптации к физическим нагрузкам у мини-пигов. *Биомедицина*. 2020;16(1):42–55. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-1-42-55>

Поступила 31.10.2019

Принята после доработки 23.01.2020

Опубликована 10.03.2020

STUDY AND EVALUATION OF MOLECULAR GENETIC SIGNS OF THE *NFE2L2* GENE EXPRESSION DURING ADAPTATION TO PHYSICAL LOADS IN MINI PIGS

Vladislav N. Karkischenko, Nataliya V. Petrova*,
Nataliya V. Stankova, Vladimir V. Slobodenyuk, Oksana V. Alimkina,
Mariya I. Kulakova, Irina A. Vasil'eva

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Svetlye gory village, building 1

This article sets out to evaluate the expression of the *NFE2L2* gene (Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2) when adapting to physical loads (achieving oxidative stress) in mini pigs. The conducted experiment reproduced natural conditions of oxidative stress in laboratory animals (16 mini pigs). Sports training is the most optimal and natural model of enhanced dissimulation as a cause of oxidative stress. The results of the study indicate that the *NFE2L2* gene encoding the Nrf2 transcription factor is actively expressed in response to oxidative stress in animal cells. The *NFE2L2* gene can serve as an evaluation criterion for molecular genetic studies of performance and endurance for individual selection by groups. Such evaluation can be recommended for studies aimed at revealing the effects of pharmacological drugs on the regenerative properties of the body, with the possible choice of pharmaceutical ingredients and extrapolation from animal studies to humans. An important practical result and an indicator of adaptation is increased performance. The possibility of affecting the expression of the *NFE2L2* gene paves the way to enhancing the body's ability to adapt to oxygen starvation.

Keywords: oxidative stress, adaptation, endurance, DNA, *NFE2L2* gene, mini pigs

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Karkischenko V.N., Petrova N.V., Stankova N.V., Slobodenyuk V.V., Alimkina O.V., Kulakova M.I., Vasil'eva I.A. Study and Evaluation of Molecular Genetic Signs of the *NFE2L2* Gene Expression during Adaptation to Physical Loads in Mini Pigs. *Journal Biomed.* 2020;16(1):42–55. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-1-42-55>

Submitted 31.10.2019

Revised 23.01.2020

Published 10.03.2020

Введение

Оксидативный стресс в силу чрезвычайной химической активности форм кислорода приводит к различным побочным эффектам, в первую очередь таким, как усиление воспалительных процессов, что ведет к разрушению клеточных и тканевых структур и, как принято считать, к старению клеток и организма в целом. Он также может являться причиной целого ряда патологических процессов (атеросклероз, нейродегенеративные заболевания, рак) [3].

Около 98% всего потребляемого клеткой кислорода восстанавливается в митохондриях до воды в процессе окислительного фосфорилирования, но 2% — за счёт побочных реакций, в основном в начале или в середине дыхательной цепи митохондрий, в т. ч. в реакциях, катализируемых цитохром С-оксидазой, — превращаются сначала в частично восстановленный супероксид кислорода, а затем — в гидроксильный радикал $\text{OH}\cdot$, также относящийся к активным формам кислорода (АФК) [4].

Активные формы кислорода (АФК, реактивные формы кислорода — РФК, англ. Reactive

Oxygen Species, ROS) включают ионы кислорода, свободные радикалы и перекиси как неорганического, так и органического происхождения. Это, как правило, небольшие молекулы с исключительной реактивностью благодаря наличию неспаренного электрона на внешнем электронном уровне. АФК постоянно образуются в живой клетке как продукты нормального метаболизма кислорода. Активные формы кислорода образуются также под действием ионизирующего излучения. Некоторые АФК могут играть роль медиаторов важных внутриклеточных сигнальных путей, однако повышенная продукция АФК приводит к оксидативному стрессу.

Естественная защита клетки от АФК осуществляется несколькими антиоксидантными ферментами (супероксиддисмутазы, каталаза и пероксиредоксины) и низкомолекулярными антиоксидантами (витамин С, глутатион, мочевиная кислота), некоторыми полифенолами [5, 6].

Важнейшим участником антиоксидантной защиты во всех клетках является **фактор транскрипции Nrf2 (ген *NFE2L2*)**, под контролем которого находятся все

гены, кодирующие детоксицирующие ферменты. Nrf2 экспрессируется во многих органах: больше всего в почках, мышцах, менее — в легких, сердце, печени и головном мозге. Наиболее изучена роль этого белка в составе редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE, или т.н. «системы трех фаз детоксификации». При нормальных условиях, в отсутствие стресса, Nrf2 поддерживается в цитоплазме кластером белков, которые быстро его деградируют. При влиянии окислительного стресса Nrf2 не разрушается, а вместо этого переходит в ядро, где связывается с промотором ДНК и инициирует транскрипцию антиоксидантных генов и их белков [2]. Во время первой фазы осуществляется связывание ксенобиотиков. Во время второй фазы уничтожаются активные формы кислорода. Белки второй фазы детоксификации — ферменты, метаболизирующие свободные радикалы, «чинящие» поврежденные клеточные структуры или же напрямую связывающие поврежденные активными формами кислорода липиды. Во время третьей фазы связанные токсины выбрасываются за пределы клетки с помощью особых насосов, которые работают за счет энергии АТФ. Ферменты, транскрипция которых индуцируется фактором Nrf во время второй фазы детоксификации, — это белки ARE (antioxidant response element — элементы, отвечающие за ответ на активные формы кислорода). При индукции синтеза ARE транскрипционный фактор Nrf перемещается в ядро. Вещества, активирующие запуск синтеза белков ARE через фактор Nrf, могут усиливать ответ на окислительный стресс и запускать синтез белков второй фазы детоксификации. Таким образом, активировав фактор Nrf, можно запустить синтез белков второй фазы детоксификации и запустить процесс «обезвреживания» активных форм кислорода — одной из основных причин старения (рис. 1) [1, 7, 8].

Возможность повлиять на экспрессию гена *NFE2L2* может усилить способность организма к адаптации в условиях кислородного голодания. Спортивная тренировка — самая оптимальная и естественная модель усиленной диссимиляции как причины оксидативного стресса. Важным практическим результатом и показателем адаптации является повышение работоспособности. Уровень физической работоспособности весьма индивидуален и зависит от многих факторов: генетический полиморфизм, пол, возраст, состояние здоровья, двигательная активность и др.

Цель работы — изучить процесс усиленного катаболизма в организме мини-пигов при достижении оксидативного стресса и провести исследование уровня экспрессии гена *NFE2L2* для оценки степени его влияния на восстановительные процессы.

Задачи:

- 1) создание естественных условий оксидативного стресса в клетках исследуемых особей мини-пигов;
- 2) сбор биоинформационного анализа последовательностей гена *NFE2L2* мини-пигов с помощью базы NCBI, специфичных для отбора наиболее перспективных нуклеотидных последовательностей для использования в синтезе праймеров и флуоресцирующего зонда;
- 3) исследования уровня экспрессии гена *NFE2L2* у мини-пигов при физической нагрузке.

Материалы и методы

Подбор экспериментальной группы лабораторных животных

Для проведения опытов по влиянию различных препаратов на работоспособность лабораторных животных требуются обученные животные, на которых возможно моделировать тренировочный процесс

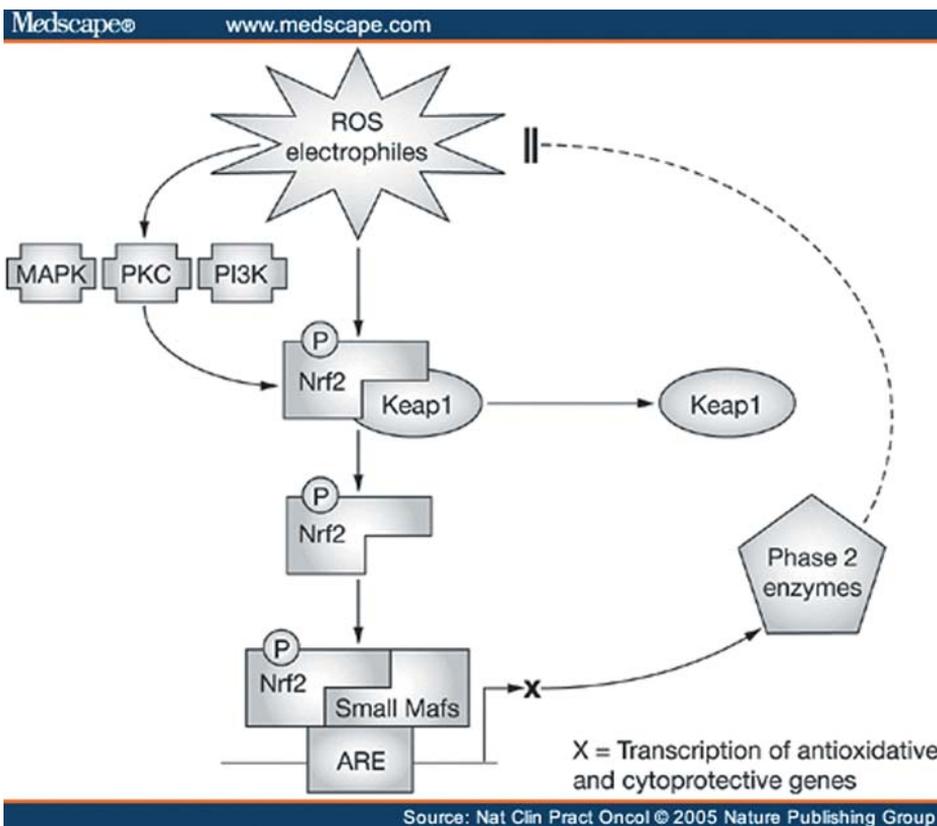


Рис. 1. Упрощенная модель активации фактора *Nrf2*.

Примечание: *Nrf2* ингибируется фактором *Keap1*. Под влиянием ROS (реактивных форм кислорода) *keap1* отсоединяется от *Nrf2*. В результате *Nrf2* фосфорилируется и образует комплексы с белками *Maf*. Активный комплекс (*Nrf-Maf*) запускает транскрипцию генов, кодирующих белки второй фазы детоксификации. Эти белки защищают клетку от активных форм кислорода.

Fig. 1. A simplified model of *Nrf2* factor activation.

Note: *Nrf2* is inhibited by *Keap1*. Under the influence of ROS (reactive oxygen species), *keap1* is disconnected from *Nrf2*. As a result, *Nrf2* is phosphorylated thus forming complexes with *Maf* proteins. The active complex (*Nrf-Maf*) launches the transcription of genes encoding proteins of the second phase of detoxification. These proteins protect cells from reactive oxygen species.

подобно спортсменам. В лаборатории спортивной биомедицины НЦБМТ ФМБА России успешно используются мини-свиньи светлогорской популяции в исследованиях работоспособности, когда животные получают физическую нагрузку во время бега на тредбане.

В эксперименте участвовали 16 животных: 8 хрячков (живая масса $7,42 \pm 1,65$ кг) и 8 свинок (живая масса $8,38 \pm 2,72$ кг) в возрасте 3,5–4,5 мес. Содержание

и кормление — в стационарных клетках из стали, индивидуально, согласно зоотехническим нормам. Помещения поддерживаются в чистом и сухом состоянии. В качестве корма для мини-свиней применяется стандартный «Комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-58» (ООО «Лабораторкорм», Россия).

Водопроводная очищенная вода всем животным дается *ad libitum* в стандартных

поилках. Животные содержатся в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18–22 °С и относительная влажность 50–60%. Освещение в помещениях — естественно-искусственное (ритм «день — ночь»), достаточное количество дневного света — 300–450 люкс. Помещения оборудованы системой приточной вентиляции воздуха.

Создание естественных условий оксидативного стресса в клетках исследуемых организмов

Для активации повышенной продукции АФК в клетках исследуемых животных применяли физическую нагрузку в виде бега на тредбане с предварительным обучением. Для бега использовали три беговых дорожки Torgo T-203. При обучении животных использовали постепенное увеличение нагрузки, дистанционный метод тренировки и принцип положительного подкрепления, электростимуляцию не применяли. Животных приучали к дорожке 1 раз в неделю в течение 3-х недель.

Сбор биоматериала для оценки уровня экспрессии исследуемых генов

В качестве исследуемых проб использовалась венозная кровь, которую, согласно табл. 1, брали из краниальной полой вены одноразовыми шприцами, фиксировали животных на V-образном столе. Кислород в крови измеряли с помощью ветеринарного монитора.

Выделение нуклеиновой кислоты из собранного биоматериала

Из исследуемого материала выделяли РНК методом магнитной сепарации с помощью набора для выделения Магно-сорб («ИнтерЛабСервис», Россия) на автоматической станции выделения нуклеиновых кислот и белков Kingfisher DUO («Thermo Scientific», Финляндия). Принцип выделения РНК с помощью набора Магно-сорб приведен в инструкции производителя.

Проведение ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

В данном случае ПЦР производят на матрице ДНК, полученной в результате обратной транскрипции одноцепочечной РНК в ДНК. Синтез первой цепи кДНК проводили согласно инструкции «Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК РЕВЕРТА-L» («ИнтерЛабСервис», Москва) при 37 °С — 30 мин в течение одного цикла.

Проведение ПЦР в реальном времени

Исследование экспрессии гена *NFE2L2* в пробах венозной крови мини-пигов производилось с помощью детектирующего амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) и специфических праймеров и зондов к генам (табл. 2).

Стадию амплификации кДНК гена *NFE2L2* в режиме реального времени проводили в 25 мкл смеси: ПЦР-буфер (×10):

Таблица 1. Пробы крови для дальнейшей оценки экспрессии гена *NFE2L2*

Table 1. Blood samples for further evaluation of the *NFE2L2* gene expression

Номер пробы	Временная точка
1	До тренировки (фон)
2	1 ч после физической нагрузки
3	10 ч после физической нагрузки
4	24 ч после физической нагрузки

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры и зонд ПЦР-системы

Table 2. Oligonucleotide primers and the PCR probe system

Праймеры и зонд	Нуклеотидная последовательность
Праймер Forward	F 5-GGCATCACCAGAACAACCTCAG-3
Праймер Reverse	R 5-GCATCACACACTGGAGCACT-3
Зонд ПЦР-системы	Z ROX-CTATGGAGACACACTGCTTGGCTTC-BHQ-2

700 mM Трис-НСl, рН 8,6/25 °С, 166 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, Taq-полимераза, на детектирующем амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США).

Подбор оптимальных условий проведения амплификации отражен в табл. 3.

Гематологическое и биохимическое исследование крови

Гематологические исследования цельной крови выполнялись на гематологическом анализаторе BC-3200 («Mindray», Китай) с забором крови в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА).

Биохимические показатели крови определяли на биохимическом анализаторе «ChemWell+» (США) с использованием реагентов фирмы «Spinreact» (Испания) в сыворотке крови без следов гемолиза.

Результаты исследований

В результате курса приучения животных к беговой дорожке была получена группа из 16-ти животных (8 хрячков и 8 свинок), способных спокойно двигаться по ней со скоростью 4 км/ч по 10–15 мин.

Эксперимент, при котором животные проходили физическую тренировку, проводился с постепенным увеличением нагрузки (скорости). Животные бегали на беговых дорожках до отказа, показывая увеличенное время на каждом новом этапе эксперимента. Между этапами делались перерывы

(1 мес.), в течение которых животные тренировались 1 раз в неделю с новыми условиями для усиления адаптации. Всего было проведено 3 этапа (табл. 4).

Данные, полученные при проведении эксперимента на беговой дорожке, выраженные в минутах, в течение которых животные справлялись с нагрузками, представлены в табл. 5. Измерения содержания кислорода в крови мини-свиней, выраженного в % от общего количества газов, проводились на 3-м этапе эксперимента.

Проведена пробоподготовка в виде выделения РНК из проб крови и дальнейший ее перевод в кДНК методом ОТ-ПЦР, а затем амплификация ПЦР в реальном времени (рис. 2).

В табл. 6 представлены данные перевода пороговых уровней в количество копий искомого гена в каждой пробе, рассчитанных с помощью программного обеспечения детектирующего амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США).

Обсуждение результатов

Светлогорские мини-свиньи оказались легкообучаемыми и проявили себя как оптимальная модель для проведения экспериментов, связанных с физическими нагрузками.

Обнаружено, что наилучшие результаты показали самцы № 4, 5 и самка № 7, наихуд-

Таблица 3. Режимы проведения амплификации в реальном времени

Table 3. Real-time amplification modes

Режимы	Температура	Продолжительность	Число циклов
Начальная денатурация	95 °С	3 мин	1
Денатурация	95 °С	20 сек	45
Отжиг	64 °С	40 сек	
Элонгация	72 °С	30 сек	

Таблица 4. План экспериментальных физических нагрузок и тренировок

Table 4. Scheme of experimental physical training

Этап эксперимента	Уровень физической нагрузки — скорость, км/ч	Кратность тренировок
1	4	1 раз в неделю в течение 1 мес.
2	5	1 раз в неделю в течение 1 мес.
3	5	1 раз в неделю в течение 1 мес.

Таблица 5. Результаты, показанные экспериментальной группой при проведении физических нагрузок, согласно плану

Table 5. Results shown by the experimental group during physical activity, according to the plan

№ пробы / животного и пол	Продолжительность нагрузки, мин			Измерения уровня кислорода (pO ₂), %	
	1-й этап	2-й этап	3-й этап	до нагрузки	после нагрузки
1♂	43	40	41	95	86
2♂	27	29	31	93	84
3♂	27	34	29	89	92
4♂	40	63	66	75	84
5♂	43	58	64	97	94
6♂	43	47	42	96	90
7♂	43	55	42	96	92
8♂	40	40	43	97	92
1♀	42	30	30	78	95
2♀	41	34	22	57	92
3♀	41	45	60	94	93
4♀	43	44	49	71	90
5♀	42	34	60	98	91
6♀	46	40	42	92	90
7♀	43	53	57	64	95
8♀	46	34	53	92	96

Примечание: согласно продолжительности выполнения нагрузки все исследуемые животные условно разделены на подгруппы. Красным цветом обозначены наихудшие результаты — длительность нагрузки составила 22–31 мин, зеленым — наилучшие (64–66 мин), оранжевым — средние показатели (42–53 мин).

Note: according to the duration of the load, all studied animals were conditionally divided into subgroups. Red indicates the worst results — the duration of the load was 22–31 minutes; green shows the best results (64–66 minutes); orange shows average results (42–53 minutes).

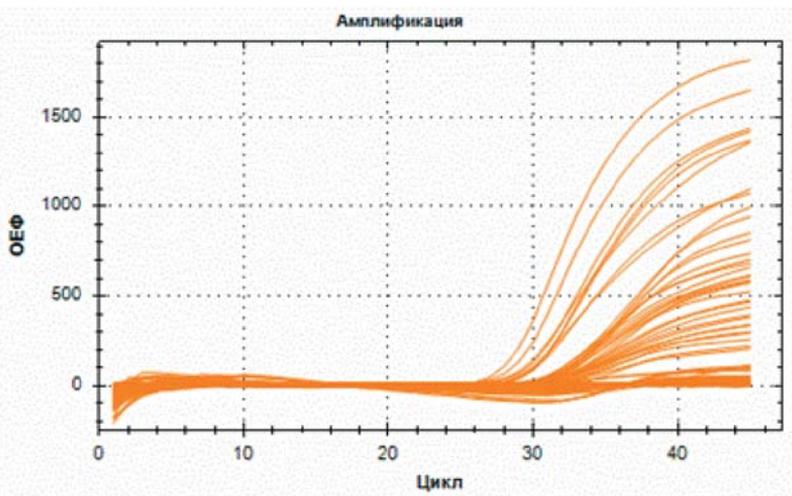


Рис. 2. Графическое изображение сигналов флуоресценции проведенной амплификации.

Примечание: пробы крови были взяты по 4-м временным точкам согласно табл. 1: до нагрузки (фон) и через 1, 10 и 24 ч после нагрузки (всего 64 пробы). По оси абсцисс — относительные единицы флуоресценции, по оси ординат — циклы амплификации.

Fig. 2. Graphical representation of the fluorescence signals obtained following amplification.

Note: blood samples were taken at 4 time points, according to Table 1: before the load (background) and 1, 10 and 24 hours after the load (total 64 samples). The abscissa and ordinate axes show relative fluorescence and amplification cycles, respectively.

Таблица 6. Результат амплификации гена *NFE2L2* в пробах, выраженный в количестве копийных участков гена
Table 6. The result of amplification of the *NFE2L2* gene in samples, expressed in the number of copy sections of the gene

Номер животного	Количество амплифицированных участков исследуемого гена в различных пробах			
	фон	1 ч после нагрузки	10 ч после нагрузки	24 ч после нагрузки
1♂	нд	4766	нд	24939
2♂ (худший)	нд	2738	8175	нд
3♂ (худший)	нд	8058	107461	8536
4♂ (лучший)	нд	1334	нд	нд
5♂ (лучший)	нд	48697	865964	48697
6♂	23714	25483	нд	5623
7♂	нд	1539927	23714	11548
8♂	23714	294273	23714	17783
1♀	20535	16548	11548	нд
2♀ (худшая)	нд	107461	25483	52330
3♀	нд	27384	107461	нд
4♀	нд	23714	нд	нд
5♀	нд	25483	48697	86596
6♀	4217	107461	нд	нд
7♀ (лучшая)	нд	6494	3652	8058
8♀	25483	69783	нд	нд

Примечание: обозначения «худший/лучший» — в соответствии с результатами, приведенными в табл. 5; нд — нет данных.

Note: the designation “worst/best” — in accordance with the results given in Table 5; нд — no data.

шее время показали самцы № 2, 3 и самка № 2 (рис. 3, 4). Данные по экспрессии гена *NFE2L2* именно этих особей представляют для исследования наибольший интерес, т. к. лучшей адаптацией теоретически должны обладать те животные, которые в наибольшей степени справляются с окислительным стрессом. Для объективного анализа также стоит отметить средние показатели: самцы № 1, 6 и 7, а также самки № 4, 6 и 8.

Исходя из этих данных, в дальнейшем анализе использовались только показатели по следующим особям: самцы № 3, 5, 7; самки № 2, 7, 8.

Наглядное сравнение полученных величин представлено на рис. 5. Указаны данные экспериментальных животных по беговым характеристикам в соответствии с полученными молекулярно-генетическими показателями гена *NFE2L2* по каждой особи.

По результатам амплификации (рис. 6) видно, что у всех животных уровень экспрессии гена *NFE2L2* снижается через 24 ч после физической нагрузки, что связано с уменьшением АФК в клетках к этому вре-

мени. Также очевидно, что у самок активность *Nrf2* проявляется меньше, что связано с меньшими физическими способностями женского организма в целом.

Картина изменения уровня экспрессии гена *NFE2L2* одинакова у особей с худшим и лучшим результатом: *Nrf2* наиболее активно экспрессируется через 10 ч после тренировки, затем, через сутки, снова достигает того же значения, что и через 1 ч после нагрузки. Следовательно, в этот период происходит интенсивная работа системы детоксификации *Keap1/Nrf2/ARE*, и *Nrf2* в большой концентрации инициирует синтез антиоксидантных белков в качестве промотора их генов, находясь при этом в ядре. В цитоплазме возникает недостаток данного фактора транскрипции, вследствие чего запускается активная экспрессия белков *Nrf2* с соответствующего гена *NFE2L2*. Вероятно, наивысшая концентрация АФК как главных факторов кислородного голодания и связанного с ним цитологического стресса достигается именно через несколько часов после тренировки (2–10 ч) из-за цепных реакций

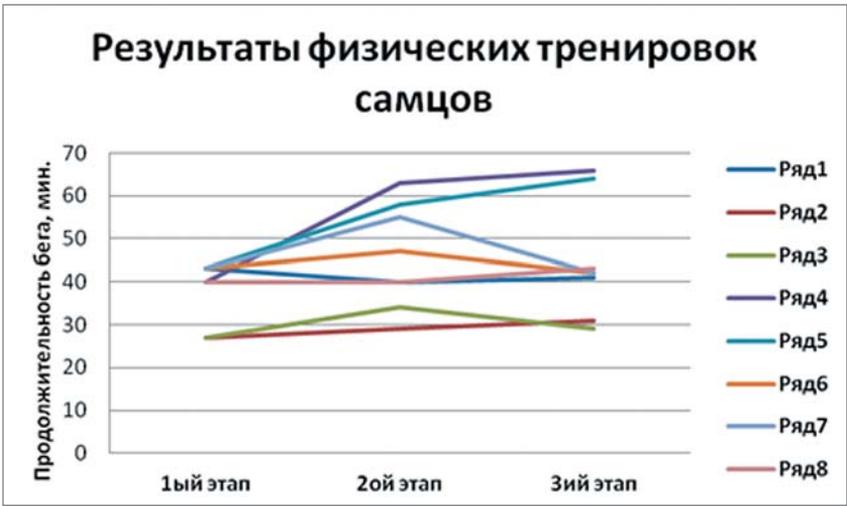


Рис. 3. Результаты, показанные самцами на всех этапах эксперимента.

Примечание: по вертикальной оси — продолжительность бега животного, выраженная в минутах; по горизонтальной оси — номер этапа эксперимента; ряд — номер животного.

Fig. 3. Results shown by males at all stages of the experiment.

Note: the vertical axis shows the duration of the animal's run, expressed in minutes; the horizontal axis shows the number of the experiment stage; the row is the number of the animal.

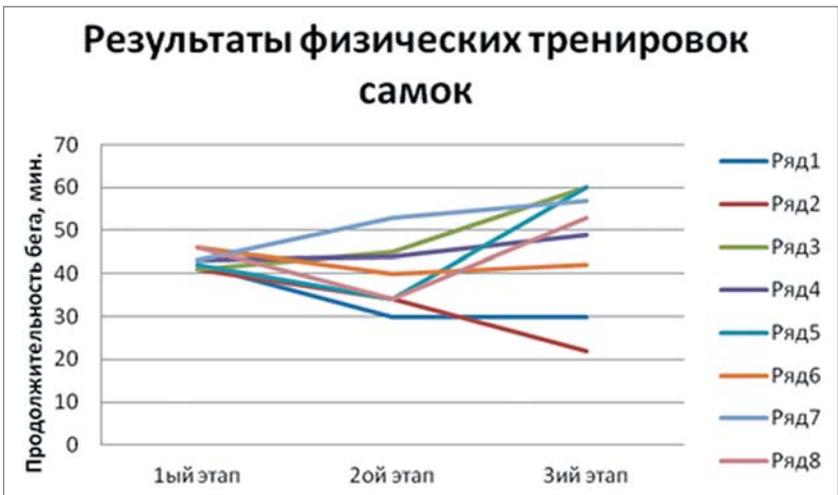


Рис. 4. Результаты, показанные самками на всех этапах эксперимента.

Примечание: по вертикальной оси — продолжительность бега животного, выраженная в минутах; по горизонтальной оси — номер этапа эксперимента; ряд — номер животного.

Fig. 4. Results shown by females at all stages of the experiment.

Note: the vertical axis shows the duration of the animal's run, expressed in minutes; the horizontal axis shows the number of the experiment stage; the row is the number of the animal.

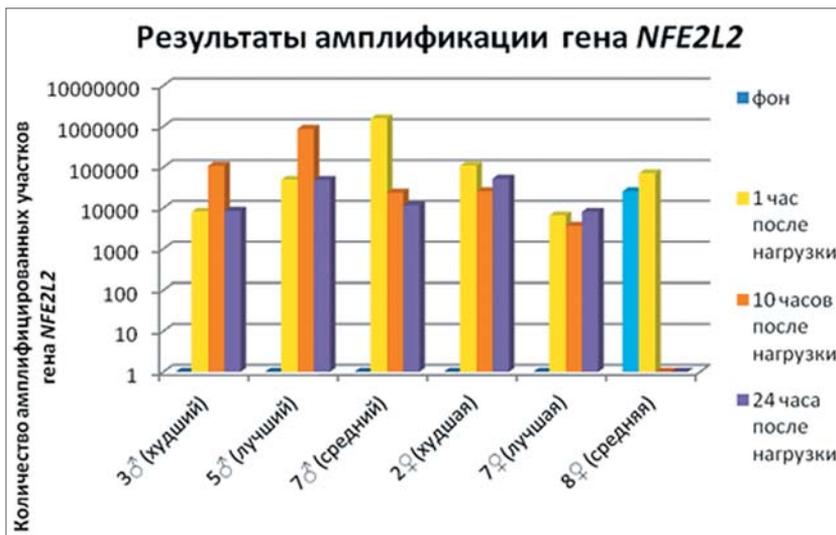


Рис. 5. Графическое сравнение результатов ПЦР в реальном времени гена *NFE2L2* у экспериментальных групп животных.

Примечание: по горизонтальной оси обозначены особи, показавшие худший/лучший/средний результат при физических нагрузках (согласно табл. 4); по вертикальной оси — количество амплифицированных участков исследуемого гена, выраженное в десятичном логарифме (число копийных фрагментов гена, см. табл. 7).

Fig. 5. Graphical comparison of real-time PCR results of the *NFE2L2* gene in experimental animal groups.

Note: the horizontal axis indicates the individuals who showed the worst/best/average results during physical activity (the designation according to Table 4); the vertical axis indicates the number of amplified sections of the studied gene, expressed in decimal logarithm (the number of copy fragments of the gene, see Table 7).



Рис. 6. Сравнение результатов экспрессии гена *NFE2L2* среди самцов, показавших лучший, худший и средний результаты физических тренировок.

Примечание: обозначение «лучший, худший и средний» — согласно табл. 5; по вертикальной оси — количество амплифицированных участков исследуемого гена, по горизонтальной оси — временные точки взятия проб ДНК.

Fig. 6. Comparison of the results of the *NFE2L2* gene expression among males who showed the best, worst and average results during physical training.

Note: The designation “best, worst and average” according to Table 5; the vertical axis indicates the number of amplified sections of the studied gene, while the horizontal axis indicates the time points for taking DNA samples.

повторного синтеза АФК, которые они же сами запускают как крайние реакционно-способные частицы. Также именно в этот период происходит достижение в клетках максимальной концентрации молочной кислоты и пирувата, которые также пролонгируют воспалительные процессы и усиливают оксидативный стресс, что увеличивает потребность синтеза клеткой белка Nrf2.

Высокий уровень экспрессии гена *NFE2L2* в пробе, взятой через 1 ч после тренировки у самца, показавшего средний результат выносливости, можно объяснить, скорее всего, сильным стрессом, который животное могло испытать во время тренировки. Это обуславливается индивидуальным темпераментом и характером данной особи. В дальнейшем, согласно рис. 6, у данного животного уровень экспрессии исследуемого гена сильно падает из-за избыточной продукции белка в первые часы.

Согласно полученным результатам по морфологическому составу крови мини-свиней (табл. 7), у всех животных обоих полов наблюдается повышение количества эритроцитов после нагрузки. Максимальных значений этот показатель достигает через 24 ч после физической нагрузки. Разница между данной точкой и исходным значением у хряков и у свинок составляет 10,1 и 9,9% соответственно. Через 48 ч после нагрузки наблюдается выравнивание данного показателя по отношению к фону. По тромбоцитам достоверных отличий нет, но прослежива-

ется тенденция к увеличению их количества через 4 ч у хряков и к 1-му ч — у свинок, затем наблюдается уменьшение. Разница по отношению к фоновым показателям не превышает 5–7%. Схожая динамика наблюдается в уровне лейкоцитов, имеется тенденция к повышению в максимальной точке — 4 ч после физической нагрузки, особенно заметна она у свинок. Разницы в лейкоцитарной формуле не отмечено.

Таким образом, физическая нагрузка у мини-свиней оказывает умеренное влияние на морфологический состав крови. Все показатели не выходят за пределы физиологической нормы.

Результаты биохимического анализа (табл. 8, 9) свидетельствуют о том, что после нагрузки как у хряков, так и у свинок отмечается снижение уровня глюкозы по сравнению с фоновыми показателями. Минимальные значения глюкозы выявлены через 1 ч. Так, у свинок снижение составляло более 40%, у хряков — более 25%. Постепенное повышение концентрации глюкозы в крови происходит начиная с 4-го часа. Динамика активности аспаратамиотрансферазы (АСТ) и креатинкиназы (КК) и у хряков, и у свинок идентична: максимальная активность достигается через 4 ч после физической нагрузки, затем идет снижение. У хряков разница между фоновым показателем и активностью АСТ спустя 4 ч составила 85%, у свинок — 162%. По КК — соответственно — 388 и 581%. Активность

Таблица 7. Морфологический состав крови мини-свиней
Table 7. Morphological blood composition of mini-pigs

Период	Хряки			Свинки		
	эритроциты, $10^{12}/л$	тромбоциты, $10^9/л$	лейкоциты, $10^9/л$	эритроциты, $10^{12}/л$	тромбоциты, $10^9/л$	лейкоциты, $10^9/л$
Фон	7,0±0,15	235±11,40	10,4±0,43	6,8±0,17	212±6,87	10,6±0,20
Сразу после нагрузки	7,2±0,14	239±11,20	11,2± 0,27	6,9±0,17	219±7,00	10,9±0,24
1 ч	7,4±0,16	243±11,50	10,3± 0,25	7,1±0,14	227±7,00	11,0±0,29
4 ч	7,7±0,16	249±11,00	10,5±0,25	7,4±0,15	222±7,53	11,2±0,18
24 ч	7,7±0,15	236±10,81	10,5±0,40	7,4±0,14	213±5,78	10,8±0,12
48 ч	7,0±0,16	236±11,28	10,4±0,26	6,8±0,10	213±5,87	10,6±0,22

Таблица 8. Биохимические показатели крови у хряков
Table 8. Biochemical blood parameters of male pigs

Период	Глюкоза, ммоль/л	АЛТ, ед./л	АСТ, ед./л	ЛДГ, ед./л	Креатинин, мкмоль/л	КК, ед./л	Лактат, мг/дл
Фон	7,65±2,2	89,0±21,6	40,9±12,1	1112±221	89,6±16,7	305±188	79,3±30,9
Сразу после нагрузки	5,6±1,3	78,8±18,8	46,8±12,3	1059±357	83,6±16,6	627±278	60,2±16,0
1 ч	5,6±0,6	85,3±23,1	59,4±11,6	1379±134	93,1±11,9	915±476	71,2±23,0
4 ч	6,1±0,9	92,7±19,7	75,5±27,2	1463±337	82,2±6,7	1489±626	71,4±16,1
24 ч	8,4±2,1	97,1±21,4	61,5±25,3	1422±189	80,6±10,5	1212±1030	79,8±45,9
48 ч	6,9±0,8	93,9±20,5	51,3±16,3	1334±138	83,5±11,5	904±507	69,5±9,6

Таблица 9. Биохимические показатели крови у свинок
Table 9. Biochemical blood parameters of female pigs

Период	Глюкоза, ммоль/л	АЛТ, ед./л	АСТ, ед./л	ЛДГ, ед./л	Креатинин, мкмоль/л	КК, ед./л	Лактат, мг/дл
Фон	8,5±1,4	83,4±12,3	40,1±10,0	1345±890	107,3±17,3	464±291	96,1±12,8
Сразу после нагрузки	7,6±2,2	95,8±8,3	68,7±14,4	1776±259	107,2±21,4	1600±775	94,9±34,8
1 ч	4,9±1,5	65,0±15,8	56,0±18,1	1245±382	73,9±8,8	1553±825	41,6±16,5
4 ч	5,3±1,6	80,9±28,4	105,0±87,7	1753±752	70,6±11,2	3159±1602	47,0±10,6
24 ч	5,8±1,2	83,2±10,6	77,0±35,7	1647±287	78,1±12,8	2522±1757	49,5±13,6
48 ч	6,1±0,9	87,9±4,7	61,3±30,9	1466±247	84,3±20,5	1668±1080	65,7±13,7

аланинаминотрансферазы (АЛТ) не имела выраженной динамики. Отмечено снижение лактата у обоих полов, причем минимальные концентрации лактата пришлось на 1 ч после физической нагрузки у свинок и непосредственно после нагрузки — у хряков. Разница между фоновыми показателями и после нагрузки составила 31 и 32% соответственно. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) у хряков показывала динамику, схожую с АСТ, и максимальная активность наблюдалась спустя 4 ч после нагрузки, что превышало фоновые показатели на 32%. Концентрация креатинина имела тенденцию к снижению после физической нагрузки. Фоновые показатели креатинина у свинок были выше, чем после нагрузки, во всех точках, у хряков — аналогично, за исключением 1-го часа, где отмечалось увеличение на 4%. Однако изменения всех представленных показателей не являются достоверными и не выходят за пределы физиологической нормы.

Таким образом, можно предположить, что показатели активности ферментов (АСТ, ЛДГ, КК) и количества субстратов (глюкозы, креатинина и лактата) в крови

мини-свиней могут служить индикаторами интенсивности нагрузки, а также работоспособности, тренированности и общего физического состояния животных.

Выводы

1. Воспроизведены естественные условия оксидативного стресса в клетках исследуемых особей мини-пигов.

2. С помощью базы NCBA собран биоинформационный анализ последовательностей гена *NFE2L2* мини-пигов, специфичных для отбора наиболее перспективных нуклеотидных последовательностей для использования в синтезе праймеров и флюоресцирующего зонда.

3. Результаты исследования свидетельствуют о том, что ген *NFE2L2*, кодирующий фактор транскрипции Nrf2, активно экспрессируется в ответ на оксидативный стресс в клетках организма животных.

4. Наибольшего пика уровень экспрессии достигает у различных особей в период от одного до десяти часов после нагрузки (большинство испытуемых животных дали максимальный результат ПЦР по пробам,

взятым через 10 ч после нагрузки), возвращаясь к норме через сутки.

5. Подтверждено, что ген *NFE2L2* может служить оценочным критерием при проведении молекулярно-генетических исследований работоспособности и выносливости для индивидуального отбора по группам.

6. Физическая нагрузка оказывает умеренное влияние на морфологический состав крови мини-свиней. Биохимические показатели активности ферментов (АСТ,

ЛДГ, КК) и количества субстратов (глюкозы, креатинина и лактата) могут служить индикаторами интенсивности нагрузки, а также работоспособности, тренированности и общего физического состояния животных.

7. Ген *NFE2L2* рекомендован для изучения влияния фармацевтических препаратов на восстановительные свойства организма, при выборе возможных фармнутриентов, допустима экстраполяция исследований в отношении человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Чечушков А.В., Ткачев В.О. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б. Участие редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE в дифференцировке и активации Т-лимфоцитов. *Бюллетень СО РАМН*. 2012;32(5):21–27. [Chechushkov A.V., Tkachev V.O. Zenkov N.K., Men'shchikova E.B. Uchastie redoks-chuvstvitel'noj signal'noj sistemy Keap1/Nrf2/ARE v differencirovke i aktivacii T-limfocitov [The participation of the redox-sensitive Keap1/Nrf2/ARE signaling system in the differentiation and activation of T-lymphocytes]. *Bulletin of the Siberian Branch of the RAMS*. 2012;32(5):21–27. (In Russian)].
2. Bobilev I., Novik V., Levi I., Shpilberg O., Levy J., Sharoni Y., et al. The Nrf2 transcription factor is a positive regulator of myeloid differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Biology & Therapy*. 2011;11: 317–329.
3. Halliwell B., Gutteridge M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 2000.
4. Itoh K., Igarashi K., Hayashi N., Nishizawa M., Yamamoto M. Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol. Cell Biol*. 1995;15(8):4184–4193.
5. Krötz F., Sohn H.Y., Gloe T., Zahler S., Riexinger T., Schiele T.M., et al. NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood*. 2002;100:917–924.
6. Sen C.K. The general case for redox control of wound repair. *Wound Repair and Regeneration*. 2003;11:431–438.
7. Surh Y., Lee J. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett*. 2005;224(2):1–84.
8. Sykiotis G., Bohmann D. Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell*. 2008;14(1):76–85.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Петрова Наталья Владимировна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Станкова Наталия Владимировна, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: sinayva@yandex.ru

Vladislav N. Karkisichenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Nataliya V. Petrova*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Nataliya V. Stankova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: sinayva@yandex.ru

Слободенюк Владимир Владимирович, к.б.н.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства
России»;
e-mail: prof-v-iprim@mail.ru

Алимкина Оксана Владимировна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства
России»;
e-mail: alimkina@scbmt.ru

Кулакова Мария Игоревна, ФГБУН «Науч-
ный центр биомедицинских технологий Фе-
дерального медико-биологического агентства
России»;
e-mail: maryvoronova91@mail.ru

Васильева Ирина Андреевна, ФГБУН «На-
учный центр биомедицинских технологий Фе-
дерального медико-биологического агентства
России»;
e-mail: rozhstul@mail.ru

Vladimir V. Slobodenyuk, Cand. Sci. (Biol.), Sci-
entific Center of Biomedical Technologies of the
Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: prof-v-iprim@mail.ru

Oksana V. Alimkina, Scientific Center of Biomed-
ical Technologies of the Federal Medical and Biolo-
gical Agency of Russia;
e-mail: alimkina@scbmt.ru

Mariya I. Kulakova, Scientific Center of Biomed-
ical Technologies of the Federal Medical and Biolo-
gical Agency of Russia;
e-mail: maryvoronova91@mail.ru

Irina A. Vasil'eva, Scientific Center of Biomedical
Technologies of the Federal Medical and Biological
Agency of Russia;
e-mail: rozhstul@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author