

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СРЕДСТВ КОРРЕКЦИИ СОСТОЯНИЯ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ИСТОЩАЮЩИХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК ПО КЛЕТОЧНЫМ И ГЕНЕТИЧЕСКИМ БИОМАРКЕРАМ

В.Н. Каркищенко, И.А. Помыткин, Н.В. Петрова*, И.А. Васильева,
О.В. Алимкина, Н.В. Станкова, Н.А. Ларюшина

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

В данной статье описано исследование влияния некоторых препаратов на экспрессию генов, используемых в качестве молекулярных мишеней, в условиях истощающей физической нагрузки у минипигов.

В проведенном эксперименте проводилась сравнительная оценка эффективности таких средств коррекции, как БАД «МيوАктив-Спорт», липосомированный мускус кабарги, интраназальный инсулин и липосомированный препарат женьшеня в условиях истощающих физических нагрузок у минипигов с использованием выбранных биомаркеров, включающих в себя исследование лейкоцитарной фракции крови и экспрессии мРНК генов *NFE2L2* и *HMGB1* в лимфоцитах. Было доказано, что наибольшим успехом в универсальном защитном действии среди изученных препаратов обладает липосомированный мускус кабарги, который при 7-дневном курсовом приеме практически полностью предотвратил провоспалительный эффект нагрузки. При этом липосомированный мускус кабарги многократно повысил экспрессию гена *NFE2L2*, отвечающего за антиоксидантную защиту организма. По своему действию липосомированный мускус кабарги превосходил эффекты референсного препарата — инсулина, защитные эффекты которого хорошо известны из научной литературы, что делает мускус кабарги перспективным объектом для применения в области медицинской реабилитации.

Ключевые слова: клеточные и генетические биомаркеры, экспрессия мРНК генов *NFE2L2* и *HMGB1*, истощающая физическая нагрузка, оценка средств коррекции, минипиги

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Петрова Н.В., Васильева И.А., Алимкина О.В., Станкова Н.В., Ларюшина Н.А. Оценка эффективности средств коррекции состояния животных в условиях истощающих физических нагрузок по клеточным и генетическим биомаркерам. *Биомедицина*. 2023;19(4):8–24. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-8-24>

Поступила 15.07.2023

Принята после доработки 10.10.2023

Опубликована 10.12.2023

EVALUATION OF APPROACHES FOR CORRECTING THE STATE OF ANIMALS UNDER DEBILITATING PHYSICAL EXERTION BY CELLULAR AND GENETIC BIOMARKERS

Vladislav N. Karkischenko, Igor A. Pomytkin, Nataliya V. Petrova*, Irina A. Vasil'eva,
Oksana V. Alimkina, Nataliia V. Stankova, Nadezhda A. Laryushina

*Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1*

In this work, we investigate the effect of a number of pharmaceutical preparations on the expression of genes, which are used as molecular targets under the conditions of debilitating physical exercise in minipigs. In the conducted experiment, the effectiveness of the following preparations was compared: “Mio-Activ-Sport” dietary supplement, a liposomal deer musk extract, intranasal insulin, and a liposomal ginseng preparation. The selected biomarkers included the leukocyte blood fraction and mRNA expression of *NFE2L2* and *HMGB1* genes in lymphocytes. Among the studied preparations, the liposomal deer musk extract showed the highest effectiveness. Thus, during seven days of therapy, this preparation almost completely prevented the pro-inflammatory effect of physical load. At the same time, the liposomal deer musk extract led to a manyfold increase in the expression of *NFE2L2* gene, which is responsible for antioxidant defense of the organism. In terms of action, the liposomal deer musk extract outperformed insulin – the reference drug, whose protective effects are well known from the scientific literature. These findings confirm the prospects of deer musk preparations for medical rehabilitation.

Keywords: cellular and genetic biomarkers, mRNA expression, *NFE2L2* and *HMGB1* genes, debilitating exercise, drug evaluation, minipigs

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

For citation: Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Petrova N.V., Vasil’eva I.A., Alimkina O.V., Stankova N.V., Laryushina N.A. Evaluation of Approaches for Correcting the State of Animals under Debilitating Physical Exertion by Cellular and Genetic Biomarkers. *Journal Biomed.* 2023;19(4):8–24. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-4-8-24>

Submitted 15.07.2023

Revised 10.10.2023

Published 10.12.2023

Введение

Исследованиям, посвященным разработкам средств и способов поддержания достаточного уровня работоспособности человека в экстремальных условиях, уделяется много внимания. В частности, разработаны различные фармакологические средства, необходимые для восстановления после тяжелых физических нагрузок.

Спортивная тренировка — самая оптимальная и естественная модель усиленной диссимиляции как причины оксидативного стресса. Важным практическим результатом и показателем адаптации является повышение работоспособности. 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. Важнейшим участником антиоксидантной защиты во всех клетках является фактор транскрипции Nrf2 (ген *NFE2L2*), под контролем которого находятся все гены, кодирующие детоксифицирующие 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.

Из всех изученных нами генов-мишеней именно *NFE2L2* наиболее полно характеризует степень физической нагрузки у модельных животных. Ранее нами было показано, что ген *NFE2L2*, кодирующий фактор транскрипции Nrf2, активно экспрессируется при физических нагрузках и может служить оценочным критерием при проведении молекулярно-генетических исследований работоспособности и выносливости у минипигов [1].

HMGB1 преимущественно локализован в ядре, где он действует как шаперон ДНК и участвует в регуляции ключевых событий, таких как образование комплексов с ДНК, изгибание ДНК, стабилизация нуклеосом, репликация ДНК, восстановление поврежденной ДНК и транскрипция генов. Однако в результате пост-трансляционных модификаций *HMGB1*, таких как ацетилирование, фосфорилирование и метилирование, ядерный *HMGB1* может переходить в цитоплазму и далее во внеклеточное пространство, где он проявляет свойства цитокина, обладая способностью связываться с рецептором конечных продуктов гликирования (RAGE), толл-подобным рецептором 4 (TLR4), а также еще с десятком других рецепторов в составе комплексов с третьими партнерами [3].

Кроме того, было показано, что ген-биомаркер *HMGB1* может быть использован для оценки влияния различных препаратов при доклинических исследованиях на лабораторных минипигах [2]. Было также показано, что истощающая физическая нагрузка вызывает кратковременное многократное повышение транскрипции гена *HMGB1* в лимфоцитах животных при увеличении числа нейтрофилов в постнагрузочном периоде (до 6 ч включительно) [3]. В совокупности эти результаты указывают на возможность использования анализа лейкоцитарной фракции крови и экспрессию мРНК генов *NFE2L2* и *HMGB1* в лимфоцитах в качестве биомаркеров, позволя-

ющих оценить индивидуальный профиль защитного действия препарата в условиях повреждающего действия истощающих физических нагрузок.

Цель работы — провести сравнительную оценку эффективности таких средств коррекции, как МиоАктив-Спорт, липосомированный мускус кабарги, интраназальный инсулин и липосомированный препарат женьшеня, в условиях истощающих физических нагрузок у минисвиней с использованием батареи биомаркеров из образца крови, включающей в себя лейкоцитарную формулу и экспрессию мРНК генов *NFE2L2* и *HMGB1* в лимфоцитах.

Материалы и методы

Животные

В работе использованы минипиги светлогорской популяции, самцы в возрасте 8–11 мес. средней массой тела $18,5 \pm 0,74$ кг ($n=16$), выведенные в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.). Животные содержались в одном помещении, в групповых станках по 4 особи, с оптимальными параметрами микроклимата и освещения для содержания крупных лабораторных животных. Использовался стандартный тип кормления — полнорационный комбикорм СК-8 (норма — 320 г/сут на голову), поение без ограничений. В день проведения теста с физической нагрузкой животных не кормили, доступ к воде не ограничивали. Исследования проводились в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС и Базельской декларацией от 2011 года о защите животных, используемых в научных целях. Все эксперименты одобрены биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Препараты

БАД «МиоАктив-Спорт», липосомированные мускус кабарги, женьшень и инсулин были приготовлены в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Тест физической нагрузки

Тест физической нагрузки проводился с использованием беговой дорожки для животных типа Pet Treadmill wikiRUN № 3 с защитной сеткой (Россия), адаптированной для минипигов [4]. Скорость движения беговой дорожки во время тестирования для всех животных в группе составила 5,13 км/ч. Регистрируемый показатель — время бега [5]. Тестирование проводили утром в специальном проветриваемом помещении при температуре 20°C.

Забор крови

Забор венозной крови для анализа клеточного состава, содержания лактата и анализа ПЦР проводился натошак из краниальной поллой вены.

Общий анализ крови

Общий анализ крови проводился на автоматическом гематологическом анализаторе Mindray BC-3600 с последующим микрокопированием мазка крови.

Определение лактата в крови

Лактат определяли с использованием тест-полосок StatStrip Lactate Test Strips («NOVA Biomedical»).

Выделение лимфоцитов

Фракцию лимфоцитов выделяли из полученных образцов крови центрифугированием с использованием фиколл-урографина (плотность — 1,077 г/мл) [6].

Выделение РНК

Для выделения тотальной РНК из лимфоцитов были использованы наборы РНК-Экстран («Синтол», Россия) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Для получения комплементарной ДНК (кДНК) были использованы наборы Реверта-Л («АмплиСенс», Россия). Для определения морфологических параметров крови изготавливались мазки на предметном стекле, окрашивание осуществлялось с помощью краски Leukodif 200 («Erba Lachema», Чехия), микрокопирование производилось на микроскопе MT4300L («Meiji Techno», Япония).

ПЦР в реальном времени

Анализ ПЦР выполняли на матрице ДНК, полученной в результате обратной транскрипции одноцепочечной РНК в кДНК. Синтез первой цепи кДНК проводили согласно инструкции «Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-Л» при 37°C — 30 мин в течение одного цикла. Исследование экспрессии гена *HMGB1* в исследуемых пробах проводилось с помощью детектирующего амплификатора CFX-96 («BioRad», США) с использованием специфических праймеров и флуоресцентных зондов, указанных в табл. 1. В качестве референсного гена был выбран ген «домашнего хозяйства» *GAPDH*. Полученные результаты нормировали на среднее значение экспрессии гена до нагрузки.

Группы животных и план исследования

План исследования показан на рис. 1. 16 животных было рандомизировано в 4 группы по 4 животных в каждой. В день окончания первой контрольной сессии животные начали получать препараты один раз в день в течение 7 последующих дней: в первой группе — БАД «МيوАктив-Спорт» (МА) в дозе 18 г на животное перорально, во второй группе — мускус кабарги липосомированный (МК) в дозе 129 мг на животное перорально, в третьей — инсулин (ИН) в дозе 9 МЕ на животное интраназально, в четвертой — женьшень липосомированный (ЖШ) в дозе 58 мг на животное перорально. На следующий день после последнего введения препаратов животных тестировали во второй сессии с физической нагрузкой.

Статистический анализ

Параметры имеют следующие обозначения: М — среднее, m — стандартная ошибка, n — объем анализируемой подгруппы, p — достигнутый уровень значимости. Данные анализировали на статистическую значимость с помощью однофакторного дисперсионного анализа

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры и зонды ПЦР-системы
Table 1. Oligonucleotide primers and PCR probes

Праймер/зонд	Олигонуклеотидная последовательность
<i>NFE2L2</i> sus F	5'-GGCATCACCAGAACACTCAG-3'
<i>NFE2L2</i> sus R	5'-GCATCACACACTGGAGCACT-3'
<i>NFE2L2</i> sus Z	ROX-CTATGGAGACACACTGCTTGGCTTC-BHQ ₂
<i>HMGB1</i> sus F	5'-TGAAGAGGATGAGGAGGAGG-3'
<i>HMGB1</i> sus R	5'-CCACCAGGACAGGGCTATCT-3'
<i>HMGB1</i> sus Z	ROX-AGGATGAGGAGGAAGAAGAAGATGA-BHQ ₂

ANOVA или двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с повторяющимися измерениями с апостериорными тестами Даннетта и Сидака. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Исходные характеристики групп

Однофакторный анализ ANOVA не выявил статистически значимых различий между группами ($p > 0,05$) по исходным по-

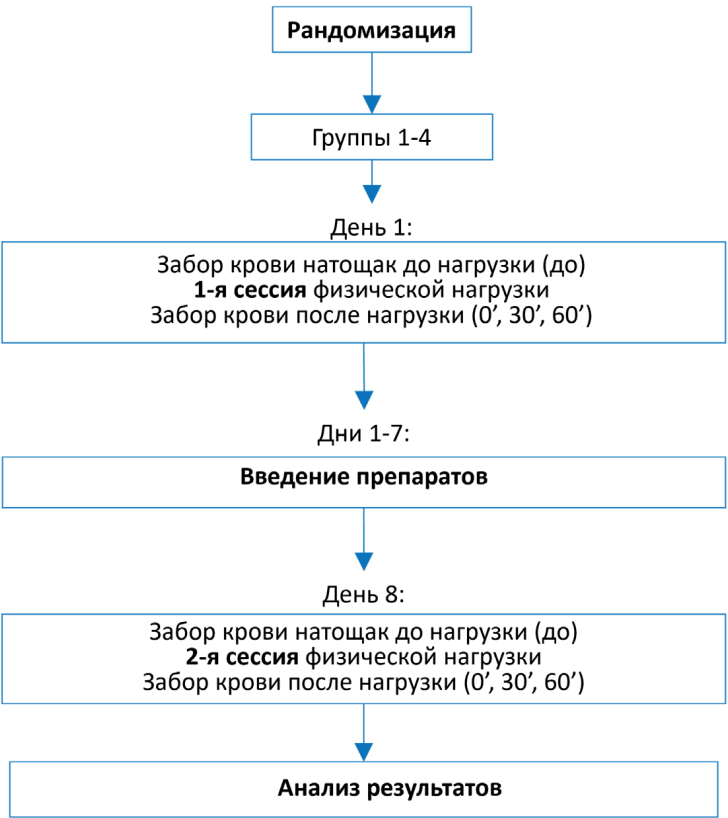


Рис. 1. План исследования.
Fig. 1. Plan of the study.

Таблица 2. Исходные характеристики животных
Table 2. Initial characteristics of animals

Параметр	Группы			
	МА	МК	ИН	ЖШ
Масса тела, кг	16,4±0,23	19,6±1,7	20,5±1,5	17,5±1,5
Нагрузка, мин	35,7±2,7	36,7±8,9	40,4±10,2	50,3±1,5

казателям массы тела и работоспособности в тесте физической нагрузки (табл. 2).

Влияние истощающей физической нагрузки на лейкоцитарную формулу

Физическая нагрузка в первой контрольной сессии (до введения препаратов) привела к однотипному острому повышению уровня лейкоцитов в крови и изменению лейкоцитарной формулы во всех исследуемых группах. Истощающая нагрузка привела к статистически значимому изменению пропорции между нейтрофилами и лимфоцитами в сторону увеличения количества нейтрофилов, что указывает на острый воспалительный процесс, связанный с физической нагрузкой (рис. 2–5А–С).

Эффект БАД «МيوАктив-Спорт» на клеточный состав крови после истощающей физической нагрузки

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект введения БАД «МيوАктив-Спорт» и фактора времени измерений (рис. 2А; $F_{1,6}=9,133$; $p=0,02$ и $F_{3,18}=16,04$; $p<0,0001$ соответственно), но не взаимодействия «препарат×время» ($p>0,05$) на количество лейкоцитов в крови после физической нагрузки. Апостериорный тест Даннетта показал, что физическая нагрузка статистически значимо привела к повышению количества лейкоцитов в первый час после окончания нагрузки как в первой контрольной сессии ($p<0,01$), так и во второй сессии после курсового приема препарата ($p<0,01$; $p<0,001$) по сравнению с донагрузочными значениями, причем площадь под кривой количества лейкоцитов в крови

в первый час после нагрузки была выше на 11,5% ($p<0,05$) после курсового приема тестируемого средства по сравнению с первой контрольной сессией.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект введения БАД «МيوАктив-Спорт» на долю нейтрофилов и лимфоцитов (рис. 2В; $F_{1,6}=11,42$; $p=0,0149$ и рис. 2С; $F_{1,6}=8,791$; $p=0,0251$ соответственно), фактора времени измерений на долю нейтрофилов и лимфоцитов ($F_{3,18}=47,72$; $p<0,0001$ и $F_{3,18}=32,33$; $p<0,0001$ соответственно) и взаимодействия «препарат×время» на долю нейтрофилов, но не лимфоцитов ($F_{3,18}=4,505$; $p=0,0159$ и $p>0,05$ соответственно) после физической нагрузки. Апостериорный тест Даннетта показал, что физическая нагрузка статистически значимо привела к повышению доли нейтрофилов и снижению доли лимфоцитов в первый час после окончания нагрузки как в первой контрольной сессии ($p<0,0001$), так и во второй сессии после курсового приема препарата ($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$; $p<0,0001$) по сравнению с донагрузочными значениями, причем площадь под кривой нейтрофилов в первый час после нагрузки была выше на 8,7% ($p<0,05$), а лимфоцитов — ниже на 18,1% ($p<0,05$) после курсового приема тестируемого средства во второй сессии по сравнению с первой контрольной сессией.

Нагрузка не влияла на уровни тромбоцитов ($p>0,05$) и эритроцитов ($p>0,05$) в крови, а также на содержание гемоглобина ($p>0,05$) по сравнению с донагрузочными значениями.

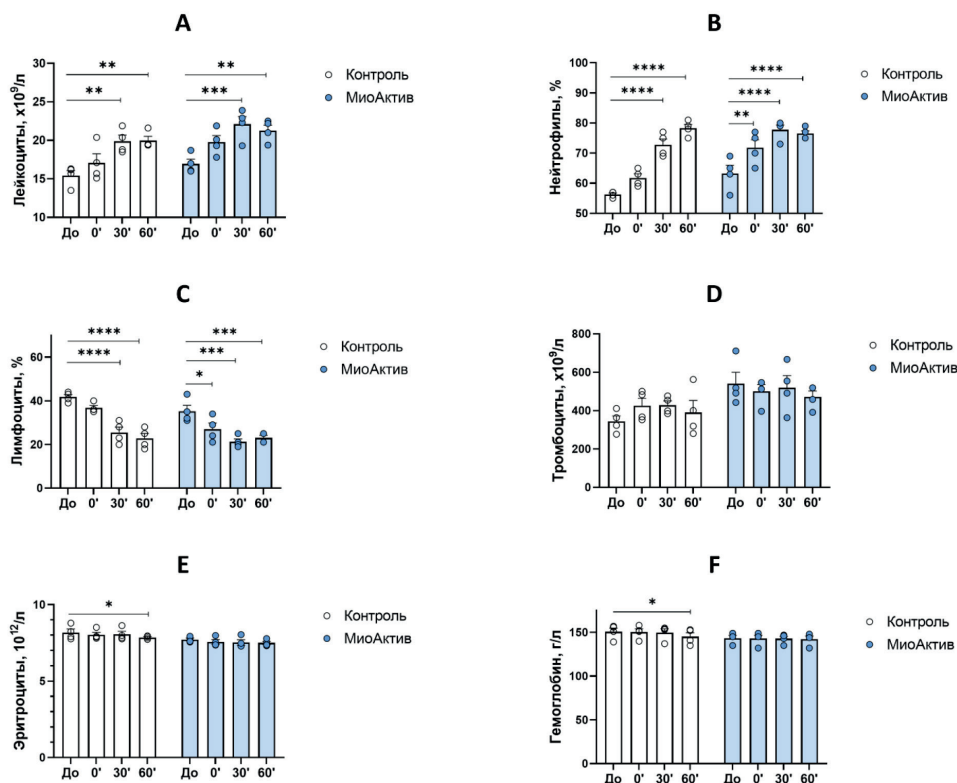


Рис. 2. Влияние физической нагрузки на количество лейкоцитов (А), процент нейтрофилов (В), процент лимфоцитов (С), количество тромбоцитов (Д), эритроцитов (Е) и содержание гемоглобина (F) в крови мини-пигов до (Контроль) и после курсового приема БАД «МيوАктив-Спорт» (МيوАктив). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$ по сравнению с исходным значением до нагрузки (двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями, апостериорный тест Даннетта).

Fig. 2. The effect of exercise on the number of leukocytes (A), the percentage of neutrophils (B), the percentage of lymphocytes (C), the number of platelets (D), erythrocytes (E) and hemoglobin content (F) in the blood of mini-pigs before (Control) and after administration of dietary supplement “MyoActiv-Sport” (MyoActive). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Note: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$ compared to baseline before exercise (two-way repeated measures ANOVA, Dunnett's post hoc test).

Эффект интраназального инсулина на клеточный состав крови после истощающей физической нагрузки

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект интраназального введения инсулина (рис. 4А; $F_{1,6}=29,24$; $p=0,0017$), времени измерений

($F_{3,18}=63,32$; $p<0,0001$) и взаимодействия «препарат×время» ($F_{3,18}=23,76$; $p<0,0001$) на количество лейкоцитов в крови после физической нагрузки.

Апостериорный тест Сидака показал, что постнагрузочные уровни лейкоцитов в крови были статистически значимо ниже во второй сессии после курсового

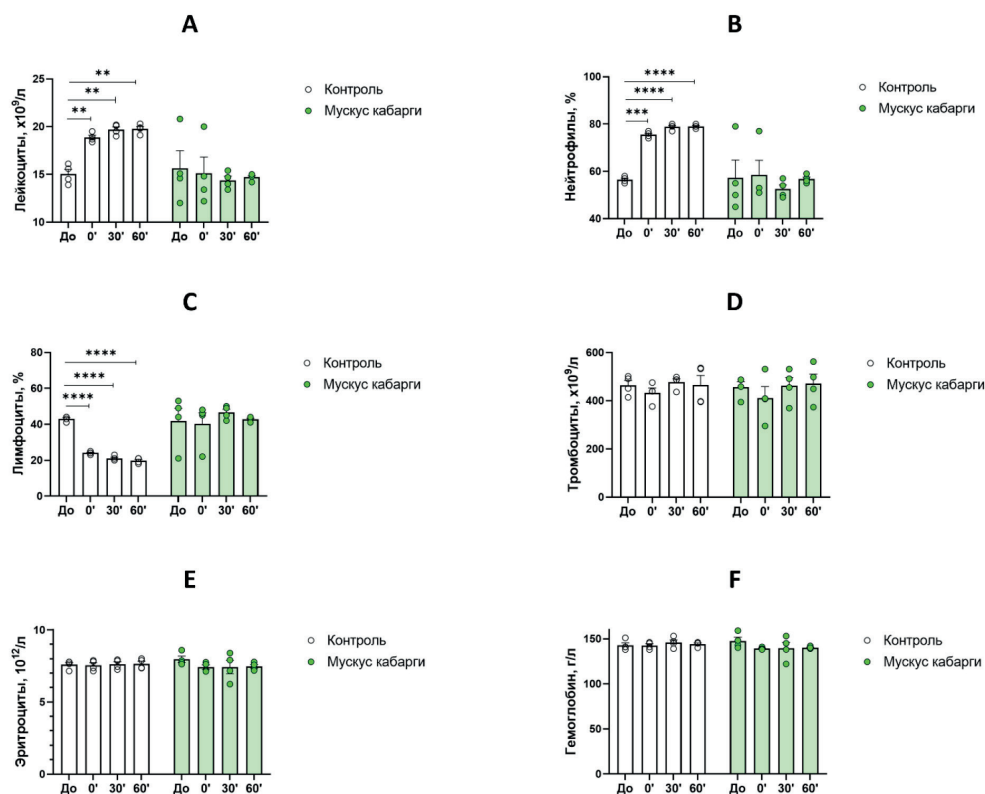


Рис. 3. Влияние физической нагрузки на количество лейкоцитов (А), процент нейтрофилов (В), процент лимфоцитов (С), количество тромбоцитов (Д), эритроцитов (Е) и содержание гемоглобина (F) в крови минипигов до (Контроль) и после курсового приема препарата Мускус кабарги липосомированный (Мускус кабарги). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.

Примечание: ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$ по сравнению с исходным значением до нагрузки (двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями, апостериорный тест Даннетта).

Fig. 3. The effect of exercise on the number of leukocytes (A), the percentage of neutrophils (B), the percentage of lymphocytes (C), the number of platelets (D), erythrocytes (E) and hemoglobin content (F) in the blood of minipigs before (Control) and after administration of liposomal Musk deer (Musk deer). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Note: ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$; **** — $p < 0.0001$ compared to baseline before exercise (two-way repeated measures ANOVA, Dunnett's post hoc test).

введения инсулина сразу после нагрузки ($p < 0,0001$) и через 30 мин после нагрузки ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующими контрольными значениями первой сессии.

Апостериорный тест Даннетта показал, что физическая нагрузка статистически значимо привела к повышению количест-

ва лейкоцитов в первый час после окончания нагрузки как в первой контрольной сессии ($p < 0,0001$), так и во второй сессии после курсового приема инсулина ($p < 0,0001$) по сравнению с донагрузочными значениями, причем площадь под кривой количества лейкоцитов в крови в первый час после нагрузки была ниже на 24,6%

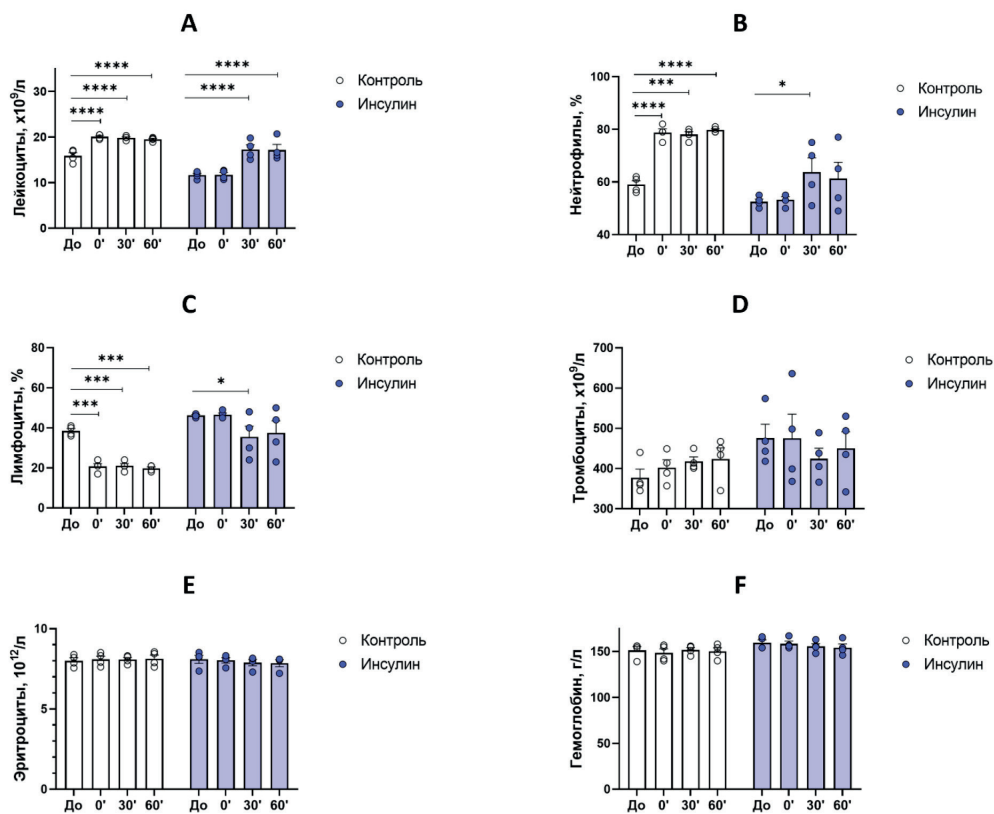


Рис. 4. Влияние физической нагрузки на количество лейкоцитов (А), процент нейтрофилов (В), процент лимфоцитов (С), количество тромбоцитов (Д), эритроцитов (Е) и содержание гемоглобина (F) в крови мини-пигов до (Контроль) и после курсового приема препарата Инсулин интраназальный (Инсулин). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.

Примечание: * — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$ по сравнению с исходным значением до нагрузки (двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями, апостериорный тест Даннетта).

Fig. 4. The effect of exercise on the number of leukocytes (A), the percentage of neutrophils (B), the percentage of lymphocytes (C), the number of platelets (D), erythrocytes (E) and hemoglobin content (F) in the blood of mini-pigs before (Control) and after administration of intranasal Insulin (Insulin). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Note: * — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$ compared to baseline before exercise (two-way repeated measures ANOVA, Dunnett's post hoc test).

($p < 0,01$) после курсового приема инсулина по сравнению с первой контрольной сессией.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект введения препарата, фактора времени изме-

рений и взаимодействия «препарат×время» на долю нейтрофилов (рис. 4В; $F_{1,6} = 26,23$; $p = 0,0022$; $F_{3,18} = 16,49$; $p < 0,0001$ и $F_{3,18} = 5,253$; $p = 0,0088$ соответственно) и лимфоцитов (рис. 4С; $F_{1,6} = 30,68$; $p = 0,0015$; $F_{3,18} = 14,64$; $p < 0,0001$ и $F_{3,18} = 4,728$; $p = 0,0133$ соответ-

венно) в составе лейкоцитов после физической нагрузки.

Апостериорный тест Сидака показал, что, хотя доли нейтрофилов и лимфоцитов в составе лейкоцитов до нагрузки не отличались между сессиями ($p>0,05$), доли нейтрофилов были статистически значимо ниже после нагрузки ($0' - p<0,0001$; $30' - p<0,05$ и $60' - p<0,01$), а доли лимфоцитов были статистически значимо выше после нагрузки ($0' - p<0,0001$; $30' - p<0,01$ и $60' - p<0,01$) у животных после курсового приема препарата по сравнению с соответствующими контрольными значениями первой сессии.

Апостериорный тест Даннетта показал, что, хотя физическая нагрузка статистически значимо привела к повышению доли нейтрофилов ($0' - p<0,0001$; $30' - p<0,001$ и $60' - p<0,0001$) и снижению доли лимфоцитов ($0' - p<0,001$; $30' - p<0,001$ и $60' - p<0,001$) в первый час после окончания первой контрольной сессии по сравнению с донагрузочными значениями, у животных, получавших интраназальный инсулин, повышение нейтрофилов было не таким выраженным ($30' - p<0,05$), как и снижение доли лимфоцитов ($30' - p<0,05$) в сравнении с донагрузочными значениями, причем площадь под кривой доли нейтрофилов была ниже на 23,1% ($p<0,01$), а доли лимфоцитов — на 74,8% выше ($p<0,01$) у животных после курсового приема инсулина, чем в первой контрольной сессии. Нагрузка не влияла на уровни тромбоцитов ($p>0,05$) и эритроцитов ($p>0,05$) в крови, а также на содержание гемоглобина ($p>0,05$) по сравнению с донагрузочными значениями.

Эффект липосомированного женьшеня на клеточный состав крови после истощающей физической нагрузки

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект времени измерений (рис. 5А; $F_{3,18}=31,27$; $p<0,0001$),

но не эффект введения липосомированного женьшеня ($p>0,05$), и взаимодействия «препарат×время» ($p>0,05$) на количество лейкоцитов в крови после физической нагрузки.

Апостериорный тест Даннетта показал, что физическая нагрузка статистически значимо привела к повышению количества лейкоцитов в первый час после окончания нагрузки как в первой контрольной сессии ($p<0,01$; $p<0,001$), так и во второй сессии после курсового приема препарата ($p<0,01$; $p<0,001$) по сравнению с донагрузочными значениями, причем площадь под кривой количества лейкоцитов в крови в первый час после нагрузки была незначимо ниже на 0,2% ($p>0,05$) после курсового приема липосомированного женьшеня по сравнению с первой контрольной сессией.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект фактора времени измерений на долю нейтрофилов (рис. 5В; $F_{3,18}=39,58$; $p<0,0001$) и лимфоцитов (рис. 5С; $F_{3,18}=38,64$; $p<0,0001$), но не эффект введения препарата ($p>0,05$) и взаимодействия «препарат×время» ($p>0,05$) после физической нагрузки. Апостериорный тест Даннетта показал, что физическая нагрузка статистически значимо привела к повышению доли нейтрофилов и снижению доли лимфоцитов в первый час после окончания нагрузки как в первой контрольной сессии ($p<0,001$; $p<0,0001$), так и во второй сессии после курсового приема препарата ($p<0,01$; $p<0,001$; $p<0,0001$) по сравнению с донагрузочными значениями, причем площадь под кривой нейтрофилов в первый час после нагрузки была незначимо ниже на 3,1% ($p>0,05$), а лимфоцитов — незначимо выше на 9,2% ($p>0,05$) после курсового приема препарата женьшеня по сравнению с первой контрольной сессией.

Нагрузка не влияла на уровни тромбоцитов ($p>0,05$) и эритроцитов ($p>0,05$) в крови, а также на содержание гемоглобина

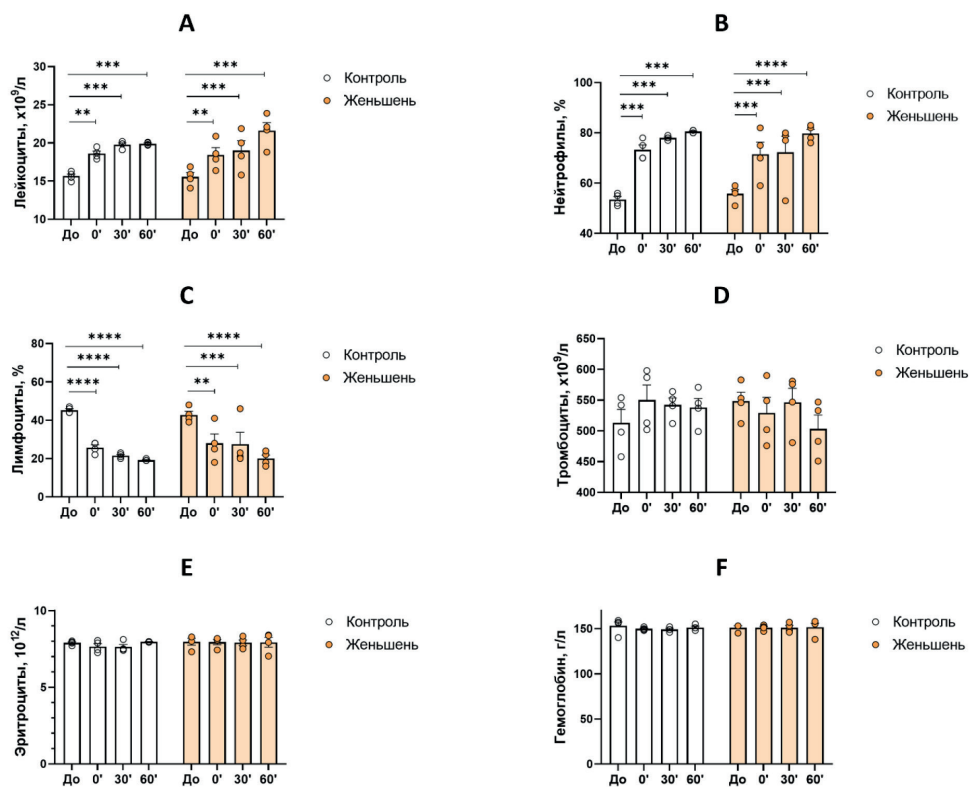


Рис. 5. Влияние физической нагрузки на количество лейкоцитов (А), процент нейтрофилов (В), процент лимфоцитов (С), количество тромбоцитов (Д), эритроцитов (Е) и содержание гемоглобина (F) в крови минипигов до (Контроль) и после курсового приема препарата Женьшень липосомированный (Женьшень). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.

Примечание: ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$ по сравнению с исходным значением до нагрузки (двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями, апостериорный тест Даннетта).

Fig. 5. The effect of exercise on the number of leukocytes (A), the percentage of neutrophils (B), the percentage of lymphocytes (C), the number of platelets (D), erythrocytes (E) and hemoglobin content (F) in the blood of mini-pigs before (Control) and after administration of liposomal Ginseng (Ginseng). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Note: ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$; **** — $p < 0.0001$ compared to baseline before exercise (two-way repeated measures ANOVA, Dunnett's post hoc test).

($p > 0,05$) по сравнению с донагрузочными значениями.

Эффект препаратов на уровень лактата в крови у минипигов до и после истощающей физической нагрузки

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями не выявил статистически значимых отличий в уровнях

лактата в крови минипигов (рис. 6; $p > 0,05$) между первой контрольной сессией физической нагрузки до приема препаратов и второй сессией после приема БАД «МيوАктив-Спорт» (А), мускуса кабарги липосомированного (В), женьшеня липосомированного (С) и инсулина интраназального (D).

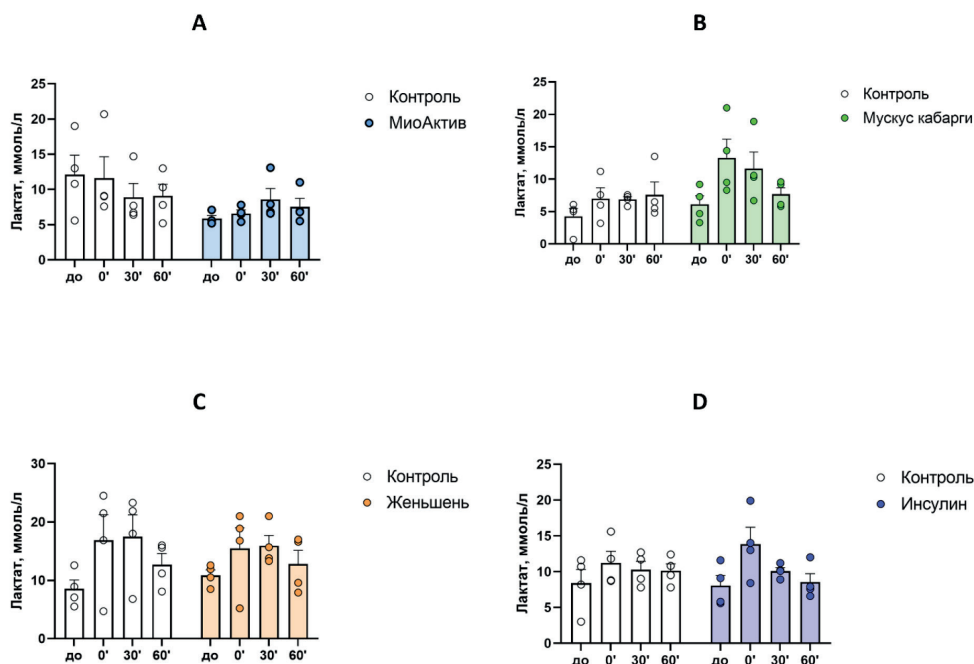


Рис. 6. Влияние физической нагрузки на уровень лактата в крови минипигов до (Контроль) и после курсового приема БАД «МиоАктив-Спорт» (А), мускуса кабарги липосомированного (В), женьшеня липосомированного (С) и инсулина интраназального (D). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.

Fig. 6. The effect of exercise on the levels of lactate in the blood of mini-pigs before (Control) and after the course of administration of dietary supplement "MyoActiv-Sport" (A), liposomal musk deer (B), liposomal ginseng (C), and intranasal insulin (D). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Эффект препаратов на экспрессию гена *NFE2L2* в лимфоцитах минипигов после истощающей физической нагрузки

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект БАД «МиоАктив-Спорт» (рис. 7А; $F_{1,6}=15,48$; $p=0,0077$) на экспрессию мРНК гена *NFE2L2* в лимфоцитах минипигов после физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии AUCдо-60' (после курсового приема тестируемого средства) была 3,1 раза выше,

чем площадь экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект мускуса кабарги липосомированного (рис. 7В; $F_{1,6}=7,987$; $p=0,0301$) на экспрессию мРНК гена *NFE2L2* в лимфоцитах минипигов после физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии AUCдо-60' (после курсового приема препарата) была 4,1 раза выше, чем площадь экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

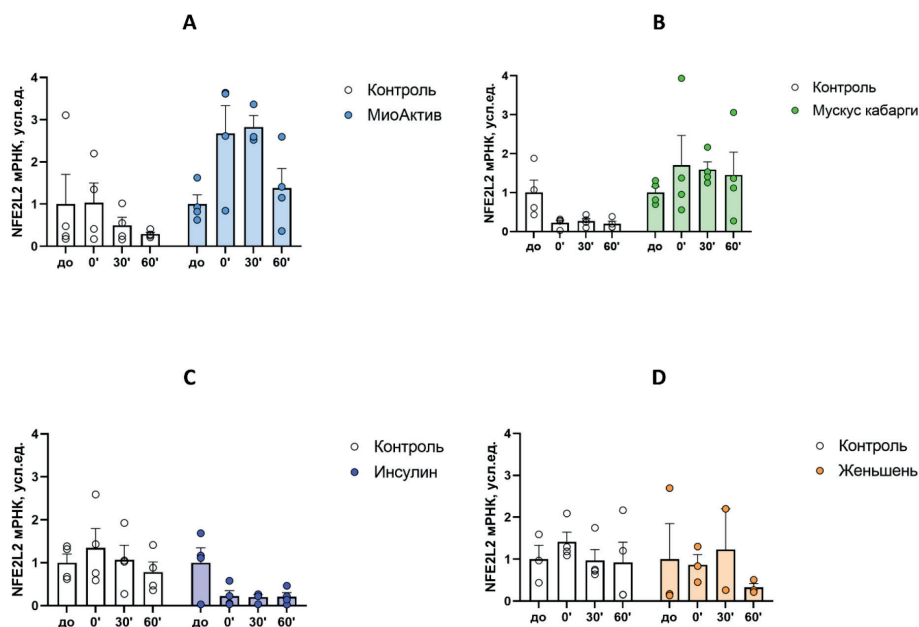


Рис. 7. Влияние физической нагрузки на уровень экспрессии гена *NFE2L2* мРНК в лимфоцитах минипигов до (Контроль) и после курсового приема БАД «МيوАктив-Спорт» (А), мускуса кабарги липосомированного (В), инсулина интраназального (С) и женьшеня липосомированного (D). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.

Fig. 7. The effect of exercise on the levels of expression of gene *NFE2L2* mRNA in the lymphocytes of mini-pigs before (Control) and after the course of administration of dietary supplement “MyoActiv-Sport” (A), liposomal musk deer (B), intranasal insulin (C), and liposomal ginseng (D). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями выявил статистически значимый главный эффект интраназального инсулина (рис. 7C; $F_{1,6}=10,92$; $p=0,0163$) на экспрессию мРНК гена *NFE2L2* в лимфоцитах минипигов после физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии AUCдо-60' (после курсового приема препарата) была 3,2 раза ниже, чем площадь экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями не выявил статистически значимых различий между экспрессией мРНК гена *NFE2L2* в лимфоцитах минипигов после физической нагрузки у животных, получавших женьшень

липосомированный ($p>0,05$), по сравнению с экспрессией этого гена в первой контрольной сессии до применения препарата.

Эффект препаратов на экспрессию гена *HMGB1* в лимфоцитах минипигов после истощающей физической нагрузки

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями не выявил статистически значимого главного эффекта БАД «МيوАктив-Спорт» (рис. 8A; $p=0,9154$) на экспрессию мРНК гена *HMGB1* в лимфоцитах минипигов после физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии AUCдо-60' (после курсового приема тестируемого средства) составляла 0,98 от площади экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

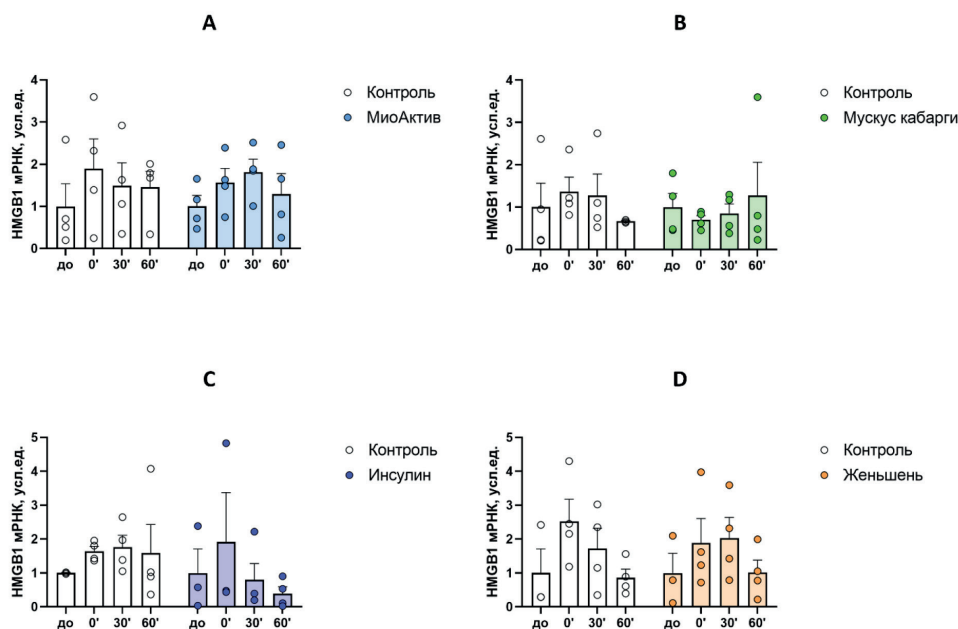


Рис. 8. Влияние физической нагрузки на уровень экспрессии гена *HMGB1* мРНК в лимфоцитах минипигов до (Контроль) и после курсового приема БАД «МيوАктив-Спорт» (А), мускуса кабарги липосомированного (В), инсулина интраназального (С) и женьшеня липосомированного (D). Ось X — время до физической нагрузки, сразу после (0'), через 30 мин (30') и 60 мин (60') после окончания нагрузки.

Fig. 8. The effect of exercise on the levels of expression of gene *HMGB1* mRNA in the lymphocytes of mini-pigs before (Control) and after the course of administration of dietary supplement “MyoActiv-Sport” (A), liposomal musk deer (B), intranasal insulin (C), and liposomal ginseng (D). X-axis — time before exercise, immediately after (0'), 30 minutes (30') and 60 minutes (60') after the end of the exercise.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями не выявил статистически значимого главного эффекта мускуса кабарги липосомированного (рис. 8В; $p=0,7572$) на экспрессию мРНК гена *HMGB1* в лимфоцитах минипигов после физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии AUCдо-60' (после курсового приема препарата) составляла 0,77 от площади экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями не выявил статистически значимого главного эффекта инсулина интраназального (рис. 8С; $p=0,3323$) на экспрессию мРНК гена *HMGB1* в лимфоцитах минипигов после

физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии AUCдо-60' (после курсового приема препарата) составляла 0,73 от площади экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

Двухфакторный анализ ANOVA с повторяющимися измерениями не выявил статистически значимого главного эффекта женьшеня липосомированного (рис. 8D; $p=0,9136$) на экспрессию мРНК гена *HMGB1* в лимфоцитах минипигов после физической нагрузки, причем площадь под кривой экспрессии мРНК в ходе второй сессии AUCдо-60' (после курсового приема препарата) составляла 0,95 от площади экспрессии этого гена в первой контрольной сессии.

Таблица 3. Эффект препаратов на биомаркеры в условиях истощающей физической нагрузки у мини-пигов
Table 3. The effect of drugs on biomarkers under conditions of exercise in mini-pigs

Препарат	Биомаркеры				
	Лейкоцитарные фракции крови			Экспрессия мРНК в лимфоцитах	
	лейкоциты	нейтрофилы	лимфоциты	<i>NFE2L2</i>	<i>HMGB1</i>
БАД «МيوАктив-Спорт»	–	–	–	+	–
Мускус кабарги липосомированный	+	+	+	+	–
Инсулин интраназальный	+	+	+	–	–
Женьшень липосомированный	–	–	–	–	–

Примечание: «+» — защитный эффект, связанный со статистически значимым снижением количества лейкоцитов, снижением доли нейтрофилов, повышением доли лимфоцитов, повышением экспрессии мРНК *NFE2L2*, снижением экспрессии мРНК *HMGB1*; «-» — отсутствие защитного эффекта, определенного выше.
Note: “+” — protective effect associated with a statistically significant decrease in the number of leukocytes, a decrease in the proportion of neutrophils, an increase in the proportion of lymphocytes, an increase in the expression of *NFE2L2* mRNA, and a decrease in the expression of *HMGB1* mRNA; “-” — no protective effect as defined above.

Заключение

Истощающая физическая нагрузка вызывает повышение числа лейкоцитов в крови, измеряемое в течение первого часа после прекращения нагрузки, которое сопровождается повышением доли нейтрофилов и снижением доли лимфоцитов в лейкоцитарной фракции крови. Приведение данных показателей к донагрузочным значениям может служить критерием оценки эффективности средств коррекции.

Эффекты исследованных препаратов на указанные выше биомаркеры суммированы в табл. 3.

Сравнение тестируемых средств показывает, что наиболее универсальным защитным действием в условиях истощающей физической нагрузки обладает мускус кабарги липосомированный, курсовой

прием которого препятствует развитию постнагрузочного воспаления, связанного с подъемом лейкоцитов и, в особенности, нейтрофилов в крови после нагрузки. Препарат мускуса повышает экспрессию гена *NFE2L2*, отвечающего за эффективность антиоксидантной системы организма и биогенез митохондрий.

Инсулин интраназальный при курсовом применении также был эффективен в подавлении постнагрузочного воспаления согласно клеточным маркерам, но не генам-маркерам.

БАД «МيوАктив-Спорт» показал защитное действие только по увеличению экспрессии гена-маркера *NFE2L2*.

Женьшень липосомированный не обладал защитным действием в условиях истощающей физической нагрузки ни по одному из тестируемых биомаркеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. 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):42–52. [Karkischenko V.N., Petrova N.V., Stankova N.V., Slobodenyuk V.V., Alimkina O.V., Kulakova M.I., Vasil'eva I.A. Issledovanie i ocenka molekulyarno-geneticheskikh priznakov ekspressii gena *NFE2L2* pri adaptacii k fizicheskim nagruzkam u mini-pigov [Study and evaluation of molecular genetic signs of the *NFE2L2* gene expression during adaptation to physical loads in mini pigs]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(1):42–52. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-1-42-55.
2. Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В., Ларюшина Н.А. Применение молекулярно-биологических методов оценки экспрессии цитокинов и сиртуинов в биомоделировании предельных

- физических нагрузок спортсменов. *Биомедицина*. 2021;17(3):10–16. [Karkischenko V.N., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V., Laryushina N.A. Primenenie molekulyarno-geneticheskikh metodov otsenki ekspressii tsitokinov i sirtuinov v modelirovanii predelnykh fizicheskikh nagruzok sportsmenov [Application of Biomolecular Methods for Estimating Cytokine and Sirtuin Expression in Biosimulation of Ultimate Physical Load of Athletes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2021;17(3):10–16. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-17-3-10-16.
3. Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Петрова Н.В., Станкова Н.В., Алимкина О.В., Фокин Ю.В., Зубалий А.М., Ларюшина Н.А., Васильева И.А. Истощающая физическая нагрузка вызывает многократное повышение транскрипции гена *HMGB1* в лимфоцитах мини-пиггов. *Биомедицина*. 2022;18(1):22–31. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Petrova N.V., Stankova N.V., Alimkina O.V., Fokin Yu.V., Zubaliy A.M., Laryushina N.A., Vasil'eva I.A. Istoschayushaya fizicheskaya nagruzka vyzyvaet mnogokratnoye povyschenye transkripsii gena *HMGB1* v limfotsitakh mini-pigov [Exhausting Physical Exercise Causes a Multiple Increase in the Transcription of *HMGB1* Gene in Mini Pigs' Lymphocytes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2022;18(1):22–31. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-1-22-31
4. Станкова Н.В., Савина М.А. Непрямой субмаксимальный нагрузочный тест PWC170 определения физической работоспособности на светлогорских мини-свиньях. *Биомедицина*. 2021;17(3E):89–94. [Stankova N.V., Savina M.A. Nepriamoj submaksimal'nyj nagruzochnyj test PWC170 opredeleniya fizicheskoy rabotosposobnosti na svetlogorskix minisvin'yax [Indirect submaximal load test PWC170 for determining physical performance on Svetlogorsk mini pigs]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2021;17(3E):89–94. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-89-94.
5. Шустов Е.Б., Фокин Ю.В., Капанадзе Г.Д., Берзин И.А., Станкова Н.В., Алимкина О.В., Матвеев Е.Л., Петрова Н.В. Сезонная динамика показателей физической работоспособности лабораторных животных. *Биомедицина*. 2016;1:66–73. [Shustov E.B., Fokin Yu.V., Kapanadze G.D., Berzin I.A., Stankova N.V., Alimkina O.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V. Sezonnaya dinamika pokazatelej fizicheskoy rabotosposobnosti laboratornykh zhivotnykh [Seasonal dynamics of indicators of physical performance of laboratory animals]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:66–73. (In Russian)].
6. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* 1968;21(Suppl 97):1–9.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

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

Васильева Ирина Андреевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: rozhtstul@mail.ru

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

Igor A. Pomytkin, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

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

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

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

Oksana V. Alimkina, Scientific Center of Biome-
dical Technologies of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;
e-mail: alimkina@scbmt.ru

Станкова Наталия Владимировна, к.б.н.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских тех-
нологий ФМБА России»;
e-mail: snv@scbmt.ru

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

Ларюшина Надежда Андреевна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;
e-mail: kichi09@mail.ru

Nadezhda A. Laryushina, Scientific Center of
Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: kichi09@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author