

ISSN 1607-0763 (Print); ISSN 2408-9516 (Online)

<https://doi.org/10.24835/1607-0763-1225>

Метод неинвазивной оценки влияния биологически активных веществ на скорость восстановления уровня рН в мышце после предельной нагрузки с помощью 1H МРС

© Берзин И.А.¹, Рябченкова А.А.^{2*}, Колмаков Н.Н.³, Зубков М.А.⁴, Богдан А.А.⁵, Копать В.В.², Духовлинов И.В.²

¹ Федеральное медико-биологическое агентство (ФМБА России); 125310 Москва, Волоколамское шоссе, д. 30, Российская Федерация

² Общество с ограниченной ответственностью "АТГ Сервис Ген"; 199178 Санкт-Петербург, пр-кт Малый В.О., д.57, к.4, литера Ж, Российская Федерация

³ ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины"; 197022 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12, Российская Федерация

⁴ Национальный исследовательский университет ИТМО; 197101 Санкт-Петербург, Кронверкский просп., д. 49, литера А, Российская Федерация

⁵ ФГБНУ "Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева Российской академии наук"; 197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 9, Российская Федерация

Цель исследования: с помощью протонной магнитно-резонансной спектроскопии (1H МРС) определить возможность неинвазивной оценки влияния креатина и бета-аланина на скорость восстановления уровня рН в мышце после предельной нагрузки.

Материал и методы. В качестве тестируемых биологически активных веществ (БАВ) были взяты креатина моногидрат и бета-аланин, применяемые согласно рекомендациям производителя. На первом этапе были построены калибровочные кривые зависимости рН от величины химического сдвига при снятии 1H спектров модельных растворов дипептида карнозина для неинвазивного определения внутримышечного рН. Далее проводились эксперименты на лабораторных животных (мыши линии BALB/c) с использованием 9 Тл ЯМР спектрометра Bruker Advance III WB 400 МГц WB (Bruker, Germany). Следующим шагом стали эксперименты на добровольцах по отработке методики оценки эффектов БАВ на прямой четырехглавой мышце бедра. Использовался функциональный тест рмс170 в варианте степ-теста, позволяющий достичь закисления цитоплазмы миоцитов лактатом и оценить эффективность исследуемых БАВ на запас выносливости и функциональность аэробных систем по скорости восстановления уровня рН исследуемой мышцы. Дальнейшее сканирование осуществлялось с помощью высокопольного магнитно-резонансного томографа (Philips Healthcare, Achieva 3.0 Тл, North Brabant, the Netherlands) и двух поверхностных кольцевидных радиочастотных катушек SENSE Flex-L.

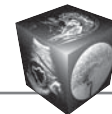
Результаты. Методом 1H МРС было оценено влияние перорального приема креатина и бета-аланина на восстановление рН прямой четырехглавой мышцы бедра после закисления цитоплазмы миоцитов лактатом. Эксперименты с участием мелких лабораторных животных показали необходимость разработки и использования более точных методик выделения вокселя и подавления сигнала от жировой ткани при доклинической *in vivo* 1H спектроскопии для надежной фиксации химических сдвигов пиков карнозина.

С помощью полученных для добровольцев протоколов удалось достичь воспроизводимости результатов, оптимальных соотношения сигнал/шум и ширины спектральных пиков карнозина с помощью 1H МРС при 3 Тл в прямой четырехглавой мышце бедра.

Заключение. Полученные с помощью 1H МРС данные на добровольцах позволяют сделать вывод, что разработанная методика дает возможность неинвазивной оценки влияния БАВ на скорость восстановления уровня рН в мышце после предельной нагрузки в режиме реального времени *in vivo*.

Ключевые слова: магнитно-резонансная томография, рН-буферизация, карнозин, БАД

Авторы подтверждают отсутствие конфликтов интересов.



Для цитирования: Берзин И.А., Рябченкова А.А., Колмаков Н.Н., Зубков М.А., Богдан А.А., Копать В.В., Духовлинов И.В. Метод неинвазивной оценки влияния биологически активных веществ на скорость восстановления уровня pH в мышце после предельной нагрузки с помощью 1H МРС. *Медицинская визуализация*. 2023. <https://doi.org/10.24835/1607-0763-1225>

Поступила в редакцию: 21.06.2022. **Принята к печати:** 09.03.2023. **Опубликована online:** 15.06.2023.

Method for non-invasive assessment of the effect of biologically active substances on the rate of the pH level restoration in the muscle after maximum load using 1H MRS

© Igor A. Berzin¹, Anastasia A. Riabchenkova^{2*}, Nikolai N. Kolmakov³, Mikhail A. Zubkov⁴, Andrey A. Bogdan⁵, Vladimir V. Kopat², Ilya V. Dukhovlinov²

¹ The Federal Medical Biological Agency; 30, Volokolamskoye shosse, 125310 Moscow, Russian Federation

² LLC ATG Service-Gene; 57, building 4, letter Zh, Maly prosp. V.O., St. Petersburg 199178, Russian Federation

³ The Federal state budgetary scientific "Institution Institute of experimental medicine"; 12, Akademika Pavlov str., St. Petersburg 197376, Russian Federation

⁴ Saint-Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics; St. Petersburg 197101, Russian Federation

⁵ N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences; 9, Akademika Pavlov str., St. Petersburg 197376, Russian Federation

Purpose of the study: To determine the possibility of a non-invasive evaluation of the biologically active substances (BAS) effect on the rate of a pH level restoration in a muscle after a maximum load using 1H magnetic resonance spectroscopy (MRS).

Materials and methods. Creatine monohydrate and beta-alanine were taken as tested biologically active substances, used according to the manufacturer's recommendations. At the first stage, calibration curves of a pH dependence on the magnitude of chemical shifts were plotted during assigning 1H spectra of model carnosine dipeptide solutions for non-invasive determination of intramuscular pH. Further experiments were carried out on laboratory animals (mice) using a 9 T NMR spectrometer Bruker Advance III WB 400MHz WB (Bruker, Germany). In experiments on volunteers the functional test pwc170 was used for assessing the ergogenic effects of biologically active substances on rectus quadriceps femoris. The test allows to achieve the level of myocytes cytoplasm acidification with lactate, and the effectiveness of functional biologically active substances on endurance, and also the function of aerobic systems by the muscle pH rate of recovery. Detection was performed using a high-field magnetic resonance imaging scanner (Philips Healthcare, Achieva 3.0T, North Brabant, The Netherlands) and two SENSE Flex-L surface ring radiofrequency coils.

Results. The effect of oral intake of creatine and beta-alanine on the restoration of rectus quadriceps femoris muscle pH after an acidification of the myocytes cytoplasm with lactate was evaluated using the 1H MRS method. Reproducible results with optimal signal-to-noise ratios and width of carnosine spectral peaks were achieved in volunteers using individual protocols and 1H MRS at 3T in the quadriceps femoris.

Animal experiments have highlighted the need to develop and use more accurate techniques for voxel extraction and fat suppression during in vivo 1H spectroscopy to reliably capture the chemical shifts of carnosine peaks.

Conclusion. The data obtained using 1H MRS on volunteers allow us to conclude that the developed method makes it possible to non-invasively assess the effect of biologically active substances on the rate of restoration of pH level in a muscle after a critical load in real time *in vivo*.

Keywords: magnetic resonance imaging, pH-buffering, carnosine, BAS

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest. The study had no sponsorship.

For citation: Berzin I.A., Riabchenkova A.A., Kolmakov N.N., Zubkov M.A., Bogdan A.A., Kopat V.V., Dukhovlinov I.V. Method for non-invasive assessment of the effect of biologically active substances on the rate of the pH level restoration in the muscle after maximum load using 1H MRS. *Medical Visualization*. 2023. <https://doi.org/10.24835/1607-0763-1225>

Received: 21.06.2022.

Accepted for publication: 09.03.2023.

Published online: 15.06.2023.



Введение

Карнозин (бета-аланил-L-гистидин) – дипептид, наиболее высокие концентрации которого были обнаружены в возбудимых тканях: в скелетной мускулатуре, сердечной мышце и нейронах [1]. Обладая многочисленными свойствами, обеспечивающими усиление физической работоспособности [2], карнозин имеет широкий спектр терапевтических применений [3, 4].

К основным физиологическим функциям карнозина относятся: pH-буферизация, активация мышечной АТФазы для обеспечения энергии, хелатирование ионов металлов (медь, цинк и железо) и гомеостаз, антиоксидантная способность (непосредственно за счет удаления активных форм кислорода (АФК) и пероксильных радикалов и косвенно за счет хелатирования металлов), а также защита от перекисного окисления липидов, окисления белков и образования усиленного гликирования белков (путем ингибирования карбонилирования белков и гликоокислации) и конечных продуктов липоксидации (путем подавления перекисного окисления липидов) [5].

Показано, что карнозин обеспечивает около 20% буферизации в мышечных волокнах I типа и до 46% в волокнах IIb типа, и эти результаты согласуются с выводами о том, что мышечные волокна I типа имеют более низкую активность гликолиза и накапливают меньше лактата, чем мышечные волокна IIb типа. Мышечные волокна IIb типа обогащены гликолитическими ферментами и большим запасом гликогена, в то время как волокна I типа содержат много митохондрий и ферментов для окислительного фосфорилирования [6]. В связи с этим кровоснабжение у мышц IIb типа слабее, а утомление развивается быстрее при большей развиваемой мощности. Закисление снижает эффективность работы цитоплазматических креатинкиназ, и таким образом наступают энергетический дефицит и утомление [7].

В скелетной мышце человека (pH 7,1), в которой отсутствует карнозинаяза-1, расщепление карнозина карнозинаязой-2 очень ограничено, поскольку оптимальное для нее значение pH 9,5, что намного выше внутриклеточного pH, а ее активность в 30 раз ниже, чем активность карнозинаязы в почках человека. Этим объясняется относительно высокая концентрация карнозина в скелетных мышцах млекопитающих [8].

В скелетных мышцах человека и лабораторных животных исследование метаболитов обычно осуществляется в биоптатах. Инвазивный характер забора материала при биопсии ограничивает ее применение. В качестве неинвазивной альтернативы может быть использована протонная магнит-

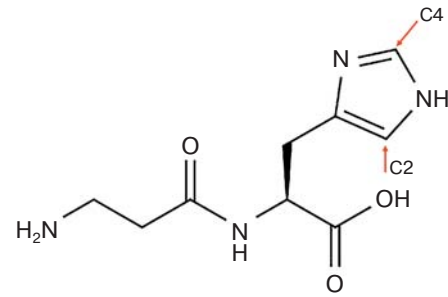


Рис. 1. pH-чувствительные протоны карнозина в имидазольном кольце гистидина.

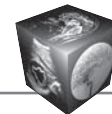
Fig. 1. pH-sensitive carnosine protons in the imidazole ring of histidine.

но-резонансная спектроскопия (^1H МРС). Метод ^1H МРС применяется при решении ряда клинических задач, в том числе для неинвазивных исследований тканей без проведения биопсии. Основными методиками получения спектров ^1H *in vivo* при этом являются PRESS (Proton Resolved Spectroscopy) и метод стимулированного эха – STEAM (Stimulated Echo Acquisition Mode) [9]. Из-за отсутствия стандартизированных протоколов получения спектров многие рентгенологи оценивают *in vivo* ^1H МРС как исследовательский метод с ограниченными возможностями для клинического применения. Однако современные публикации свидетельствуют о клинической ценности ^1H МРС, стимулируя разработку протоколов получения и анализа спектров ^1H *in vivo*, что способствует включению метода ^1H МРС в стандартные протоколы исследования, так как он дает возможность получения воспроизводимых результатов [10].

Для определения pH в ^1H МРС используются имидазольные протоны гистидина. В исследованиях белков и внутриклеточного pH эритроцитов [11, 12] было показано, что под влиянием изменения pH происходит химический сдвиг пиков протонов при C-2 и C-4 атомах имидазольного кольца (рис. 1).

Этот метод был расширен исследователями [13], которые использовали гистидинсодержащий дипептид карнозин для определения pH в изолированной мышце лягушки.

Последующие аналогичные исследования были проведены на мышцах человека [14] и крысы с использованием ансерина [15, 16]. Есть данные по измерению образования молочной кислоты и ее клиренса в мышце предплечья человека после тренировки с помощью ^1H МРС. Одновременно закисление тканей отслеживали с помощью ^{31}P МРС [17]. Лактат достаточно быстро диффун-



дирует из мышц в кровотоки: в течение 10 мин, поскольку основным местом его деградации в организме является печень. Получить с помощью фосфорной МРС спектры, показывающие восстановление мышечного рН за счет использования чувствительного к рН химического сдвига Рi-резонанса, не всегда возможно из-за резкого падения концентрации Рi после тренировки [18]. Кроме того, при фосфорной спектроскопии объем сканирования значительно больше объема брюшка прямой мышцы бедра, а получение удовлетворительных по соотношению сигнал/шум результатов длительно, что определило выбор в пользу 1H МРС. Таким образом, использование 1H спектроскопии для измерения внутриклеточного рН является обоснованным.

Физическая нагрузка связана с увеличением притока Ca^{2+} в миофибриллы скелетных мышц (для регулировки миозин-актиновых поперечных мостиков и потенциала действия вдоль мембраны мышечных волокон) и выработкой АФК и H^+ скелетными мышцами. Влияние приема БАВ, влияющих на концентрацию АФК и H^+ и улучшающих мышечную функцию, может быть оценено в зависимости от выполняемой мышцей работы с помощью двух рН-чувствительных протонов в имидазольном кольце гистидина карнозина, имеющих в 1H МРС спектре сигналы, различающиеся по значению химических сдвигов [19].

Материал и методы

Для интерпретации результатов, полученных с использованием 1H МРС на добровольцах, предварительно были проведены эксперименты с использованием лабораторных животных и модельных растворов креатина и карнозина в физиологических концентрациях для построения калибровочной кривой зависимости рН от величины химического сдвига (Δppm) между характерными пиками карнозина.

Материал

1. Животные

В экспериментах было использовано 5 половозрелых самцов (10 нед, 25 ± 2 г) мышей линии Balb/c в условиях инъекционной анестезии (роме-тар 10 мг/кг, золетил 40 мг/кг, внутривенно). Также контролировались частота дыхания и температура тела.

2. Добровольцы

В исследовании приняло участие 5 волонтеров-мужчин в возрасте 25–35 лет со средним уровнем физической активности: эти мужчины тратят некоторое свободное время (1–2 раза

в неделю) на активные формы отдыха, такие как быстрая ходьба, легкий бег или посещение тренажерного зала или бассейна.

Снятие спектров для определения восстановления уровня рН осуществлялось в три этапа с интервалом 1 нед между снятием контрольных спектров при воздействии нагрузки без приема БАВ и снятием экспериментальных спектров при воздействии нагрузки после приема креатина и бета-аланина (неделя между различными БАВами). Все оценки проводились преимущественно в одно и то же время дня. Участники предварительно были осведомлены о воздержании от алкоголя и тяжелых физических нагрузок в течение 48 ч до посещения, а также от стимуляторов (кофе, чай и иные напитки с кофеином) и еды за 4 ч до занятий.

Во время первого этапа эксперимента регистрировались отсутствие заболеваний и уровень физической подготовки, измерялись масса тела волонтеров и рост. Уровень подготовки (гетерогенности) оценивался с помощью анкеты, которую волонтеры заполняли самостоятельно [20, 21].

МР-оборудование

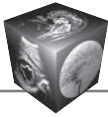
Эксперименты с использованием модельных растворов и эксперименты на лабораторных животных были проведены с использованием 9 Тл ЯМР-спектрометра Bruker Advance III WB 400 МГц WB (Bruker, Germany), зонда MICWB40 (Bruker, Germany) и РЧ-катушки типа птичья клетка для регистрации сигналов ядер водорода (1H 040/030 QTR).

Эксперименты по отработке методики по оценке эффектов БАВ на прямой четырехглавой мышце бедра добровольцев проводились с помощью высокопольного магнитно-резонансного томографа (Philips Healthcare, Achieva 3.0 Тл, North Brabant, the Netherlands) и двух кольцевидных поверхностных РЧ-катушек SENSE Flex-L. В ходе сканирования две поверхностные кольцевидные РЧ-катушки крепились непосредственно к исследуемой *quadriceps femoris muscle* – прямой четырехглавой мышце бедра, обладающей преимущественно мышечными волокнами II типа.

Параметры экспериментов с использованием 1H МРС

1. Модельные растворы

Эксперименты по построению калибровочной кривой зависимости рН от величины химического сдвига при снятии 1H спектров модельных растворов для неинвазивного определения внутримышечного рН были проведены с применением импульсной последовательности PRESS в вок-



селе 4 мм³. В эксперименте были использованы модельные растворы креатина и карнозина в натрий-фосфатном буфере рН от 6,0 до 7,4 (с шагом 0,1) с концентрациями веществ, соответствующими нормальному содержанию креатина и карнозина в мышечной ткани (20 и 8 мМ соответственно) [22, 23]. При снятии водородных спектров основным является сигнал протонов воды, вследствие чего необходимо использовать адаптированные протоколы для его подавления и получения адекватных спектров присутствующих в мышце веществ, для чего в последовательности PRESS (TE1 = TE2 = 10 мс, TR=2000 мс, 384 усреднения) использовалась методика подавления сигнала воды VAPOR с 8 РЧ-импульсами эрмитовой формы.

2. Животные

В ходе 1H МР-исследований на мышинной модели после введения анестезии животное было зафиксировано в зонде. Перед снятием спектров на мышцах предварительно были получены 1H МР-изображения высокого разрешения для установления правильного расположения вокселя в мышцах бедра. Шиммирование осуществлялось относительно пробирки со стандартным раствором, прикрепленной к мыши. После установления верного расположения вокселя было произведено локальное сканирование на мышце бедра с применением импульсных последовательностей PRESS (90-180-180) и STEAM (90-90-90) с импульсами эрмитовой формы. Параметры сканирования варьировались в следующих диапазонах: TE = 20–100 мс, TR = 2000–10000 мс, количество усреднений с 4 до 1280, линейный размер кубического вокселя от 2 до 8 мм, спектральная ширина подавления воды методикой VAPOR от 300 до 1000 Гц, верхние границы параметров, в частности TR, TE и количества усреднений, часто были ограничены (а соответственно, было ограничено и количество и качество получаемых данных) вследствие воздействия анестезии и охлаждения мышши внутри томографа.

3. Методика проведения функционального теста рwс170 с последующим получением 1H спектров

Для неинвазивной оценки влияния креатина и бета-аланина на скорость восстановления уровня рН в мышце после предельной нагрузки сочетали методологию определения внутриклеточного рН с помощью 1H МРС с функциональным тестом рwс170. Функциональный тест рwс170 в варианте степ-теста позволяет достичь закисления цито-

плазмы миоцитов лактатом [24] и оценить влияние исследуемых БАВ на запас выносливости и функциональность аэробных систем по скорости восстановления уровня рН исследуемой мышцы.

Мышечная функция оценивалась по снятию 1H спектров до и сразу после рwс170. Сканирование осуществлялось при фактических (не экстраполированных) ЧСС 170 в минуту [25, 26].

Каждое восхождение производилось на 4 счета на ступеньку высотой 40–45 см: на 2 счета подъем и на следующие 2 счета – спуск. Скорость восхождения на ступеньку при выполнении первого этапа: 1-я нагрузка – 40 шагов в минуту, 2-я нагрузка – 60–80 шагов в минуту. Далее – пауза 3 мин. При выполнении второго этапа: 1-я нагрузка – 40 шагов в минуту, 2-я нагрузка – 90–100 шагов в минуту (на эти цифры устанавливают метроном). После 3 мин восхождений на ступеньку высотой 40 см с фиксированной интенсивностью рабочая нагрузка для второго этапа могла быть вручную скорректирована в зависимости от ЧСС. Пульс подсчитывался за 10 с в конце каждого этапа.

Сканирование проводилось перед физической нагрузкой (контроль) и сразу после степ-теста. Прием креатина и бета аланина в дозировке 5 г осуществлялся за час до проведения степ-теста. Наблюдение динамики изменения рН мышцы требовало максимального сокращения времени перед снятием спектров, что осуществлялось за счет снижения числа усреднений и задержки между физической нагрузкой, измерением пульса и сканированием. Предварительные исследования проводились при 128 усреднениях – при этом время первого сканирования составляло порядка 10 мин, что не позволяло поймать момент восстановления рН мышцы после наступления acidosis (экспериментально было установлено, что период восстановления рН в данном случае – в среднем до 11 мин). При сокращении числа усреднений до 64 и соответственно сокращении времени сканирования до 5 мин удалось получить спектры надлежащего качества для расчета требуемых химических сдвигов. При этом время сканирования позволяло получить данные для определения начального рН мышцы после нагрузки. Для построения графика восстановления уровня рН после нагрузки при приеме БАВ использовались 5–7 последовательных сканирований до полного восстановления уровня рН (до контрольного уровня каждого волонтера). Итоговыми параметрами 1H МР-исследования были выбраны: PRESS-последовательность с TE = 29 мс, TR = 2000 мс, 64 усреднения, режим подавления воды – water excitation, параметры вокселя 2 × 2 × 3 см. Перед

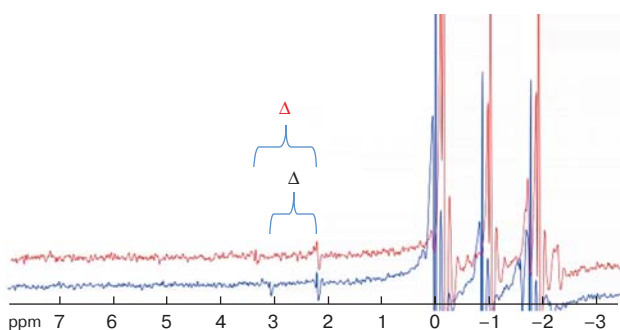
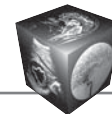


Рис. 2. Пример химического сдвига протонов имидазольного кольца свободного карнозина в зависимости от изменений pH для модельных растворов (точками указаны вершины пиков карнозина). Синий – pH 7,4 ($\Delta = 0,82\text{ppm}$), красный – pH 6,6 ($\Delta = 1,11\text{ppm}$).

Fig. 2. An example of the chemical shift of imidazole ring protons of free carnosine depending on changes in pH for model solutions (points indicate carnosine peaks). Blue – pH 7.4 ($\Delta = 0.82\text{ppm}$), red – pH 6.6 ($\Delta = 1.11\text{ppm}$).

снятием спектров были получены 1H МР-изображения высокого разрешения для установления правильного расположения вокселя в мышцах бедра.

Параметры подавления липидов и воды при 1H МРС подбирались индивидуально для каждого волонтера и групп волонтеров с учетом функциональных особенностей тканей, попадающих в поле сканирования.

На полученных спектрах при обработке в приложении iNMR (США) при выравнивании характерных пиков карнозина, соответствующих 8-му атому углерода в имидазольном кольце гистидина карнозина, отчетливо видны химические сдвиги, по значениям которых были вычислены соответствующие значения pH по разнице резонансных частот протонов водорода при С2 и С4 атомах имидазольного кольца. Для каждой кривой данные обрабатывались отдельно. Пример химического сдвига протонов имидазольного кольца свободного карнозина в зависимости от изменений pH представлен на рис. 2.

Результаты

1. Построение калибровочной кривой зависимости pH от величины химического сдвига протонов имидазольного кольца свободного карнозина при снятии 1H МРС модельных растворов

При исследовании полученных в результате Фурье-преобразования спектров модельных растворов креатина и карнозина (20 и 8 мМ соответственно) в натрий-фосфатном буфере с перемен-

ным pH были получены величины химических сдвигов для построения калибровочной кривой, поскольку известно, что при изменении уровня pH расстояние между двумя характерными пиками карнозина, выраженными в ppm, изменяется линейно [27].

Полученные значения химических сдвигов С2 и С4 атомов гистидина карнозина (Δppm) модельных растворов были обработаны в приложении iNMR (США) и использованы для построения калибровочной кривой, демонстрирующей сходимость с калибровочной кривой, построенной на основе рис. 1 и 2 литературных данных [27]. Получившаяся кривая была в дальнейшем использована для определения pH в мышечной ткани (рис. 3). Построенный нами график в сравнении с кривой, построенной на основе литературных данных, имеет более пологую кривую за счет большего числа экспериментальных измерений, соответствующих буферным растворам с установленными значениями pH, тогда как в приведенном исследовании исходный раствор титровали внесением HCl. Для последующих расчетов уровня pH по графикам были построены линии тренда. Для кривой из литературных источников построили полиномиальную кривую. Степень полинома увеличивалась до тех пор, пока не было достигнуто значение коэффициента детерминации 1. Достаточной степенью полинома оказалось уравнение 4-й степени. Аналогичную кривую (4-й степени) построили для данных, полученных нами на растворах. Дальнейшее определение pH в эксперименте производили с использованием полученного уравнения.

2. Отработка методики по оценке эффектов БАВ с помощью 1H МРС на мелких лабораторных животных

Перед снятием спектров на мышцах были получены 1H МР-изображения высокого разрешения для установления правильного расположения вокселя в мышцах бедра. Соответственно, на рис. 4 показано расположение вокселя в пробирке со стандартным раствором, а на рис. 5 – границы вокселя в мышце. Шиммирование осуществлялось относительно пробирки со стандартным раствором.

Взаимосвязь качества получаемого спектра с размером вокселя, количеством усреднений и длительностью сканирования, ограниченной сверху физиологическими особенностями сканируемых животных, привела к практической невозможности детектирования пиков карнозина в выделяемом вокселем объеме: либо по причине

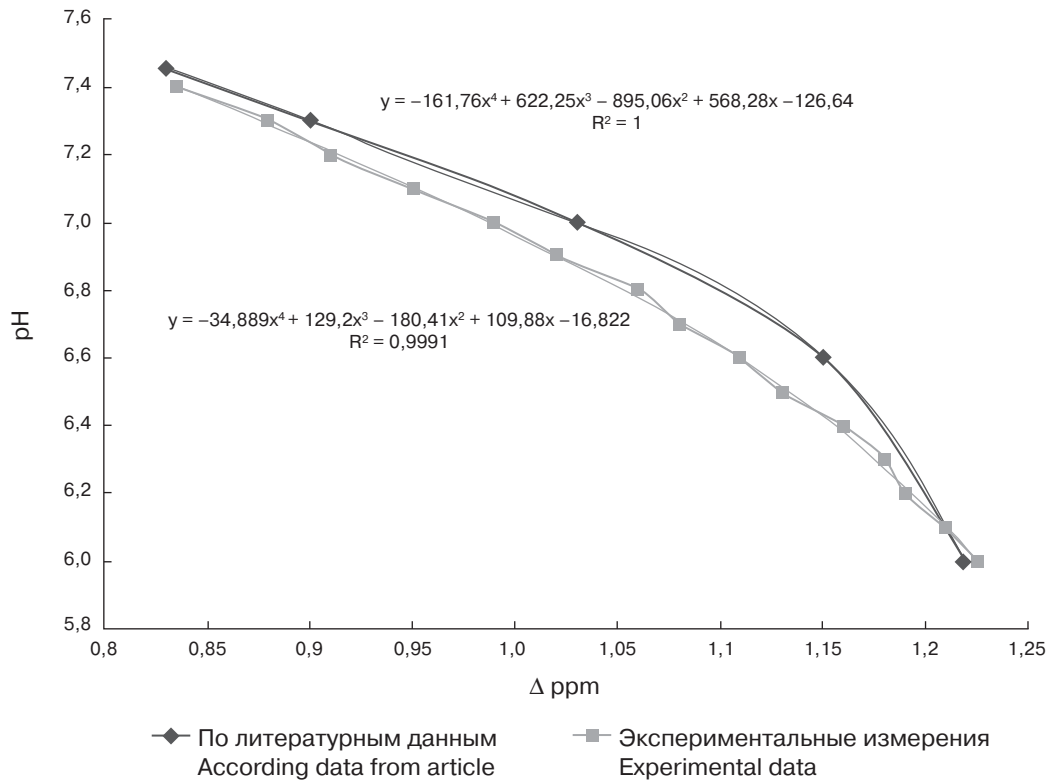
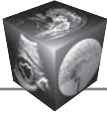


Рис. 3. Построенная калибровочная кривая зависимости pH от величины химического сдвига (Δ ppm) между характерными пиками карнозина.

Fig. 3. The calibration curve of a pH dependence on the magnitude of the chemical shift (Δ ppm) between the peaks of carnosine.

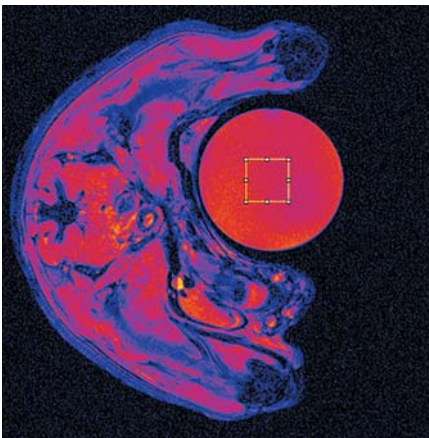


Рис. 4. Расположение вокселя (4 мм) в пробирке со стандартным раствором креатин-карнозина в натрий-фосфатном буфере.

Fig. 4. Location of the voxel (4 mm) in a test tube with a standard solution of creatine-carnosine in sodium phosphate buffer.

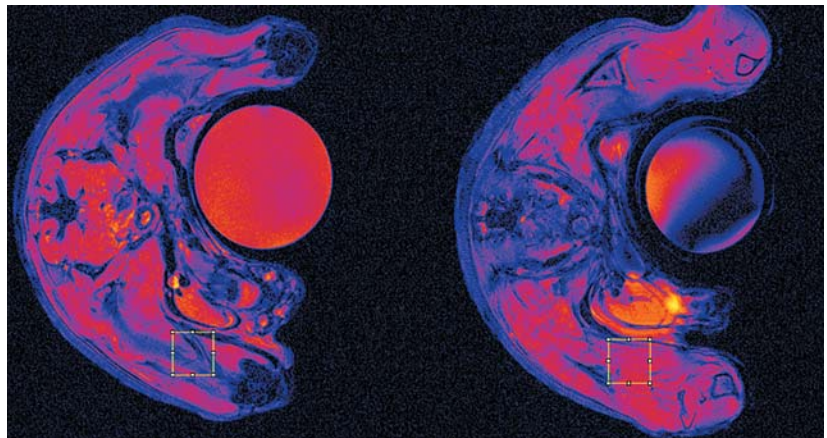
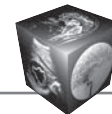


Рис. 5. Верхняя и нижняя границы вокселя (4 мм) в мышцах левого бедра лабораторных животных.

Fig. 5. Upper and lower voxel boundaries (4 mm) in muscles of the left thigh of laboratory animals.



низкого отношения сигнал/шум в малом вокселе, либо из-за попадания жировой ткани в область сканирования при увеличении размера вокселя.

В многочисленных проведенных экспериментах для любого позиционирования вокселя при использовании известных подходов возникали сильные сигналы воды и липидов, поскольку намагниченность карнозина намного меньше, чем намагниченность этих метаболитов. Применение различных вариаций частотно-селективных импульсов не позволило эффективно подавить амплитуды водного и липидного пиков из-за небольших вариаций амплитуд статического магнитного и радиочастотного полей. Соответственно, ни при автоматическом, ни при ручном шиммировании не удалось достичь гомогенности магнитного поля в исследуемом объеме и получить видимый сигнал пиков карнозина.

При минимальном номинальном размере вокселя использованные РЧ-импульсы с учетом ограничения на их длительность и форму не могут возбудить протоны только внутри требуемого профиля вокселя. Реальный профиль тогда состоит из неравномерно возбужденных протонов как внутри вокселя, так и вблизи границ вокселя, в том числе из небольшого остаточного колебательного возбуждения протонов у границ извне возбужденного среза и даже на большем расстоянии от желаемого положения вокселя. Таким образом, вне зависимости от выбранного номинального объема вокселя в спектрах присутствует значительный вклад компонент жировой ткани.

Соответственно, при использовании рассмотренных сочетаний напряженности магнитного поля томографа, количества накоплений, размера вокселя, типа возбуждающих РЧ-импульсов и параметров подавления сигнала воды в селектируемом объеме ткани животного содержится излишнее количество примесей сигналов жировой ткани. Последнее приводит к невозможности детекции карнозина в промежутки времени, ограниченные условиями эксперимента.

В литературных данных подобные исследования карнозина скелетной мускулатуры лабораторных животных еще не были описаны. Предположительно, шиммирование относительно пробирки с модельным раствором в агарозном геле для создания более однородного магнитного поля, использование более селективных импульсов или локальных подкожных РЧ-катушек позволило увеличить селективность получаемого сигнала.

В связи с этим на следующем этапе были проведены 1H МР-исследования на добровольцах, поскольку исследуемый объем может быть более гомогенным.

3. Отработка методики по оценке эффектов БАВ с помощью 1H МРС на прямой четырехглавой мышце волонтеров

Измерения проводили в камбаловидной мышце голени и в прямой четырехглавой мышце бедра. Уровень закисления камбаловидной мышцы при выбранной функциональной нагрузке оказался недостаточным для практического измерения, поэтому основные тесты были проведены на *quadriceps femoris muscle* – прямой четырехглавой мышце бедра, обладающей преимущественно гликолитическими мышечными волокнами [28]. Использование двух кольцевидных поверхностных РЧ-катушек было оптимизировано путем ее наложения непосредственно над исследуемой мышцей (рис. 6), что позволило добиться большей однородности профиля чувствительности приемной катушки в пределах рассматриваемого объема и значительно улучшить соотношение сигнал/шум, а также уменьшить влияние гемодинамических артефактов.

Полученные *in vivo* сигналы карнозина широкие, малой амплитуды, близкие к уровню шума, наблюдается уширение спектральных пиков, расщепление (расфазировка) и появление спутников, возбужденные протоны имеют тенденцию к диполь-дипольным взаимодействиям, однако это удается скорректировать увеличением времени восстановления намагниченности и количества усреднений, что тем не менее удлиняет время сканирования (рис. 7) [29, 30].

При снятии спектров с помощью метода 1H МРС без оценки влияния исследуемых веществ (контроль) был получен ряд спектров, представленных на рис. 8: при выравнивании характерных пиков карнозина, соответствующих 8-му атому углерода в имидазольном кольце гистидина карнозина, отчетливо видны химические сдвиги, по значениям которых были вычислены соответствующие значения рН по разнице резонансных частот протонов водорода при $\text{C}2$ и $\text{C}4$ атомах имидазольного кольца. Для каждой кривой данные обрабатывались отдельно. Полученные усредненные данные представлены в таблице.

Полученные данные демонстрируют, что после проведения функционального теста рН прямой четырехглавой мышцы восстанавливался до уровней, показанных до проведения степ-теста. Используемая методика снятия протонных спектров позволяет зафиксировать момент мышечного ацидоза и период восстановления мышцы (рис. 9).

Согласно полученным результатам, прием препарата креатина приводит к ускорению восстановления нормального внутриклеточного рН мышечной ткани в сравнении с контролем.

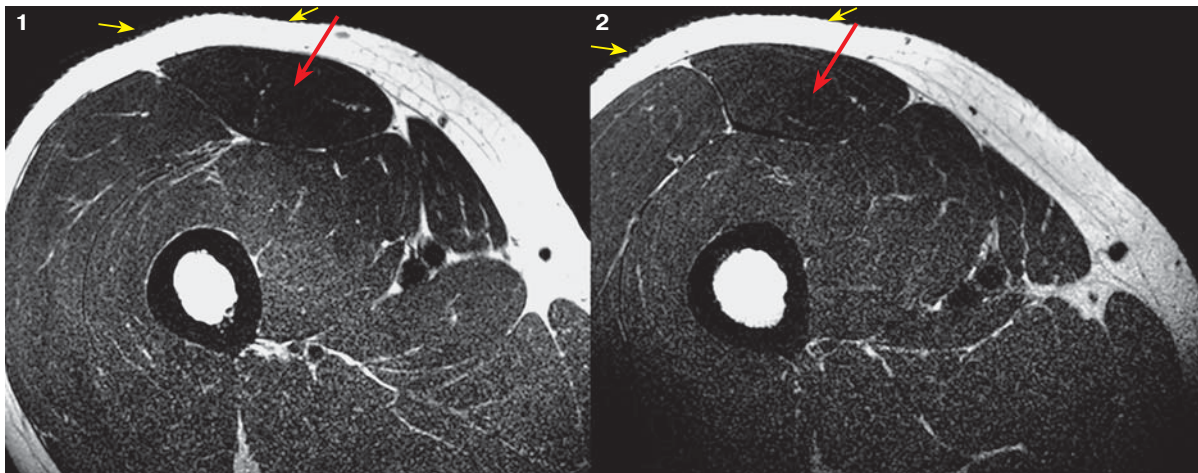
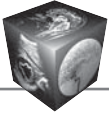


Рис. 6. Прямая четырехглавая мышца бедра, рассматриваемая при снятии протонных спектров. 1 – прямая четырехглавая мышца до функционального теста рмс170; 2 – после нагрузки; желтые стрелки – место приложения двух поверхностных кольцевидных радиочастотных катушек SENSE Flex-L.

Fig. 6. Rectus quadriceps femoris examined when taking proton spectra. 1 – rectus quadriceps muscle before pwc170 functional test; 2 – after loading; yellow arrows – the place of application of two SENSE Flex-L surface ring radiofrequency coils.

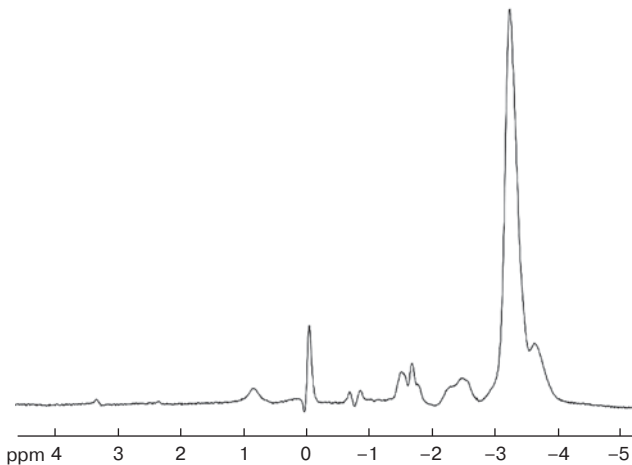


Рис. 7. Характерный профиль полученных сигналов карнозина после нагрузки при использовании PRESS (TE = 29 мс, TR = 3000 мс, 128 усреднений, подавление воды – water excitation) (сигнал протонов воды $\Delta = 4,7$ ppm приравнен к 0).

Fig. 7. Characteristic profile of obtained carnosine signals using PRESS (TE = 29 ms, TR = 3000ms, 128 averages, water excitation) (water proton signal $\Delta = 4.7$ ppm set to 0) after exercises.

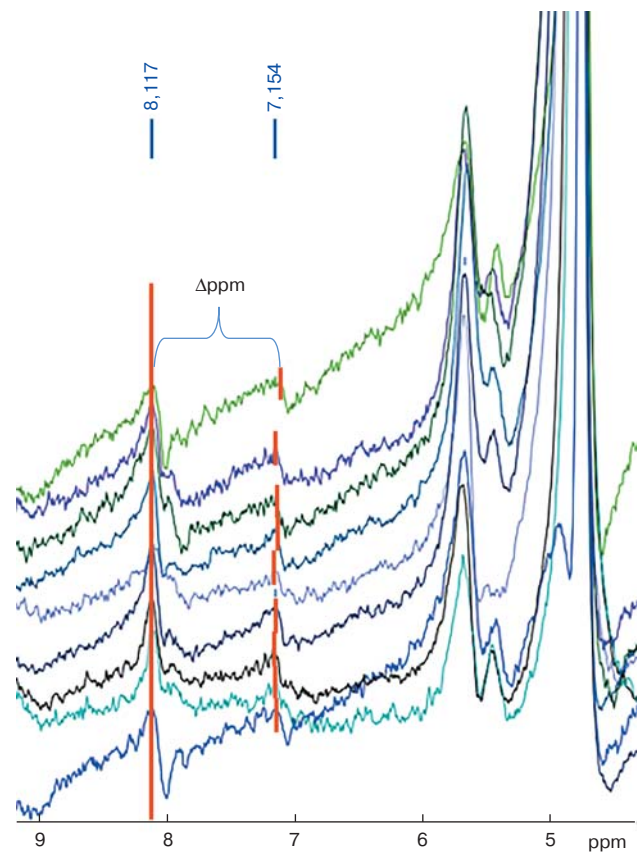


Рис. 8. Химические сдвиги протонов имидазольного кольца карнозина в зависимости от изменений pH после нагрузки при контрольных измерениях PRESS (TE = 29 мс, TR = 2000 мс, 64 усреднения).

Fig. 8. Chemical shifts of carnosine imidazole ring protons depending on pH changes after exercise in control PRESS measurements (TE = 29 ms, TR = 2000 ms, 64 averages).

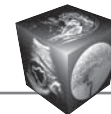


Таблица. Величины химических сдвигов и вычисленные по ним значения pH, отражающие динамику восстановления
Table. Values of chemical shifts and pH values calculated from them, reflecting the dynamics of recovery

Время, мин Time, min	Контроль / Control			Креатин / Creatine			Бета-аланин / Beta-alanine		
	сдвиг, Δ ppm shift, Δ ppm	pH*	ст. откл. standard deviation	сдвиг, Δ ppm shift, Δ ppm	pH*	ст. откл. standard deviation	сдвиг, Δ ppm shift, Δ ppm	pH*	ст. откл. standard deviation
7	1.162	6.366	0.025	1.140	6.470	0.063	1.224	5.998	0.017
11	1.073	6.731	0.034	1.000	6.959	0.026	1.190	6.215	0.026
16	1.062	6.768	0.021	0.986	6.999	0.015	1.140	6.470	0.021
19	1.055	6.791	0.018	0.968	7.050	0.034	1.054	6.794	0.052
24	0.979	7.019	0.043	0.962	7.066	0.024	0.966	7.055	0.048
29	0.958	7.078	0.028	0.900	7.234	0.046	0.962	7.066	0.034

* pH вычислен на основании измеренных химических сдвигов по построенной ранее калибровочной кривой (см. рис. 3).

* pH was calculated from the measured chemical shifts using the previously constructed calibration curve (Fig. 3).

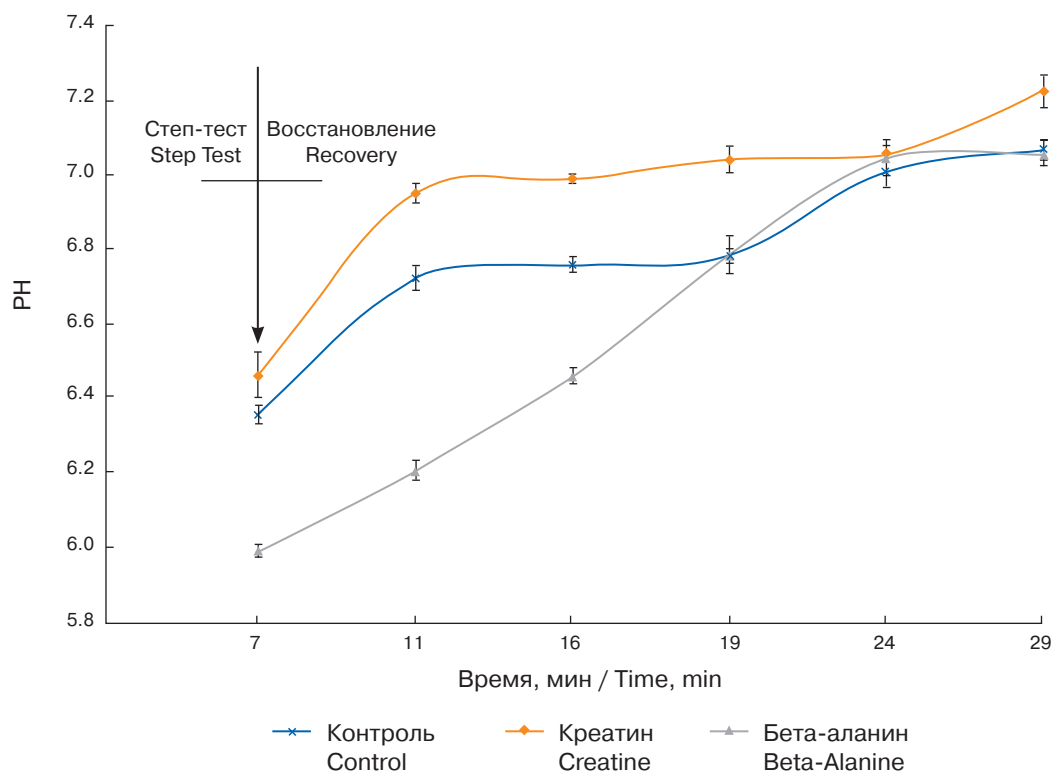
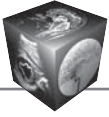


Рис. 9. Динамика восстановления pH в зависимости от времени (мин) при приеме креатина и β -аланина.

Fig. 9. pH recovery curves depending on time (min) after a creatine and β -alanine supplementation.



Разовый прием бета-аланина накануне нагрузочного теста приводит к замедленному восстановлению рН мышц после развития закисления. С помощью полученных протоколов для отдельных волонтеров удалось достичь воспроизводимости результатов и оптимальной ширины спектральных пиков карнозина при условии формирования группы волонтеров со схожими физическими данными.

Обсуждение

Одним из наиболее важных параметров качества при снятии ^1H МР-спектров является селективность регистрируемого сигнала в выбранном объеме. Подобранные последовательности измерений и параметры должны исключать любой интенсивный сигнал из областей за пределами интересующего объема. При ^1H МР-исследованиях прямой четырехглавой мышцы бедра такими критическими структурами оказались подкожная жировая клетчатка и гемодинамические артефакты вследствие нагрузочной активности – они дают очень сильный сигнал в полученном спектре по сравнению с анализируемыми сигналами карнозина. Также следует минимизировать и избегать появления в спектрах сигналов-артефактов: за счет наложения нескольких областей локализации, артефактов движений, химического сдвига, артефактов за счет вихревых токов.

Ввиду анатомии исследуемой мышцы оказалась оправданным использование поверхностных катушек нестандартным способом, а именно осуществлять наложение двух частей катушки непосредственно на саму мышцу, а не по обе стороны от бедра. Данная методика позволяет значительно снизить уровень шума в получаемых спектрах.

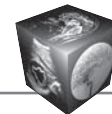
Наблюдение сигналов от протонов в связанных состояниях часто требует коротких времен эха в воксельной спектроскопии, однако наложение сигналов будет оставаться причиной трудностей при отделении сигналов разных метаболитов. Эту проблему частично преодолели, выполняя серии сканирования с различными параметрами измерения (время эха, количество накоплений) для подбора параметров сканирования и путем распределения людей в группы по степени влияния гемодинамических артефактов. Используя короткое время эха (11–30 мс), мы получили в том числе дополнительные сигналы от метаболитов с коротким временем релаксации T_2 или с эффектами J-связи. Спектры, полученные при коротких временах эха, иногда трудно обработать, поскольку колебания базовой линии превышают амплитуду пиков.

Также при измерениях *in vivo* сложности при обработке представляет взаимное перекрытие пиков различных метаболитов.

В ходе работы было отмечено, что гетерогенность между людьми с различной физической подготовкой ощутимо сказывается как на используемых протоколах проведения степ-теста и снятия спектров, так и на получаемых результатах. Возникновение гемодинамических артефактов и их отражение в получаемых спектрах грозит потерей данных и требует индивидуальной корректировки в момент регистрации данных. С другой стороны, гемодинамические артефакты имеют схожий профиль проявления в спектрах у людей со схожими физическими данными, что позволяет использовать данную методику не только для изучения влияния самих БАВ, но и для сравнительных экспериментов между группами атлетов различных направлений спортивных дисциплин при условии строгого и корректного формирования таких групп. Для этого рекомендуется не только использовать анкетирование, но и проводить предварительный МР-скрининг [23, 24].

Для отработки методики получения адекватных результатов при оценке эффективности БАВ с помощью метода ^1H МРС потребовалось провести ряд испытаний по подбору корректных протоколов, в большинстве своем утверждаемых индивидуально для каждого волонтера с учетом особенностей тканей, попадающих в поле спектрометра, общего уровня тренированности, а также гемодинамических артефактов, сказывающихся на режиме подавления воды. Соответственно, не все полученные спектры имели измеримые значения рН.

Нам удалось оценить действие веществ с выраженным эффектом с использованием описанной методики. При этом мы наблюдали отличные от контроля кривые восстановления рН в мышцах после закисления при разовом приеме креатина и бета-аланина. В случае приема креатина это связано с ускорением ресинтеза фосфокреатина, снижением накопления неорганического фосфата и большим значением рН в мышцах после нагрузки [31]. В случае с бета-аланином замедление скорости восстановления рН, по всей видимости, связано с пиковым накоплением вновь синтезированного карнозина в мышцах, что приводит к увеличению буферной емкости в клетках [32]. Одновременно с этим бета-аланин вызывает усиление гликолиза, способствуя накоплению большего количества $[\text{H}^+]$ ионов при одновременном увеличении устойчивости мышц к закислению. Как следствие, требуется больше времени в покое для восстановления нормального значения рН в мышце [33].



Заключение

В результате исследования методом ^1H МРС было оценено влияние перорального приема креатина и бета-аланина на восстановление нормофункции прямой четырехглавой мышцы бедра после стандартизированного функционального теста rwc170 в варианте степ-теста: по скорости восстановления уровня pH в исследуемой мышце, оцениваемого при снятии ^1H спектров дипептида карнозина, делался вывод об эффективности использованных БАВ. Предварительно были проведены эксперименты по построению калибровочной кривой зависимости pH от величины химического сдвига при снятии ^1H спектров модельных растворов. На животной модели была подчеркнута необходимость разработки и использования более точных методик выделения вокселя и подавления сигнала от жировой ткани при доклинической *in vivo* ^1H спектроскопии для надежной фиксации химических сдвигов пиков карнозина.

В ходе отработки протоколов на добровольцах удалось достичь воспроизводимости результатов и оптимальной ширины спектральных пиков карнозина с помощью ^1H МРС при 3 Тл в прямой четырехглавой мышце бедра. Поверхностная РЧ-катушка позиционировалась наложением непосредственно на исследуемую мышцу. Несмотря на то что низкая амплитуда сигнала, низкое отношение сигнал/шум, изменение положения вокселя и гемодинамические артефакты являются основными источниками ошибок в данном типе исследований, полученные с помощью ^1H МРС протоколы сканирования и данные позволяют сделать вывод, что разработанная методика может использоваться для оценки эффективности исследуемых препаратов для спортивной и медицинской практики, равно как и проведения сравнительных экспериментов между группами атлетов различных направлений спортивных дисциплин при условии строгого и корректного формирования таких групп.

Финансирование

Финансирование осуществлялось в частном порядке компанией ООО “АТГ Сервис Ген”, работа Зубкова М.А. по составлению методик *in vivo* сканирования была поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-15-2021-592).

Соблюдение этических стандартов

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с действующим законодательством РФ и “Consensus Author Guidelines

for Animal Use” (IAVES, 23 July 2010). В исследовании с участием добровольцев от всех участников были получены добровольные информированные согласия на участие в исследовании. В тексте рукописи участники эксперимента обезличены.

Благодарности

Авторы выражают глубокую признательность коллективу ресурсного центра “Магнитно-резонансные методы исследования” СПбГУ, коллективу кабинета магнитно-резонансной томографии отделения лучевой диагностики клиники ИМЧ РАН.

Участие авторов

Берзин И.А. – концепция и дизайн исследования, написание текста, подготовка, создание опубликованной работы.

Рябченкова А.А. – обзор публикаций по теме статьи, проведение исследования, анализ и интерпретация полученных данных, написание текста, подготовка и редактирование текста.

Колмаков Н.Н. – участие в научном дизайне, проведение исследования, статистическая обработка данных, анализ и интерпретация полученных данных.

Зубков М.А. – проведение исследования, сбор и обработка данных, подготовка и редактирование текста.

Богдан А.А. – проведение исследования, сбор и обработка данных, подготовка и редактирование текста.

Копать В.В. – участие в научном дизайне, проведение исследования, ответственность за целостность всех частей статьи.

Духовлинов И.В. – участие в научном дизайне, ответственность за целостность всех частей статьи, утверждение окончательного варианта статьи.

Authors' participation

Berzin I.A. – concept and design of the study, написание текста, подготовка, создание опубликованной работы.

Riabchenkova A.A. – review of publications, conducting research, analysis and interpretation of the obtained data, writing text, text preparation and editing.

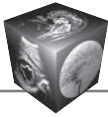
Kolmakov N.N. – participation in scientific design, conducting research, statistical analysis, analysis and interpretation of the obtained data.

Zubkov M.A. – conducting research, collection and analysis of data, text preparation and editing.

Bogdan A.A. – conducting research, collection and analysis of data, text preparation and editing.

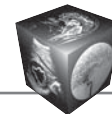
Kopat V.V. – participation in scientific design, conducting research, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Dukhovlinov I.V. – participation in scientific design, responsibility for the integrity of all parts of the article, approval of the final version of the article.



Список литературы [References]

1. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol. Rev.* 2013; 93:1803–1845. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2012>
2. Saunders B., Elliott-Sale K., Artioli G.G. et al. β -Alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Sports Med.* 2017; 51: 658–669. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2016-096396>
3. Artioli G.G., Sale C., Jones R.L. Carnosine in health and disease. *Eur. J. Sport. Sci.* 2018; 19: 30–39. <https://doi.org/10.1080/17461391.2018.1444096>
4. Matthews J.J., Artioli G.G., Turner M.D., Sale C. The Physiological Roles of Carnosine and β -Alanine in Exercising Human Skeletal Muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2019; 51: 2098–2108. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002033>
5. Wu G. Important roles of dietary taurine, creatine, carnosine, anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health. *Amino Acids.* 2020; 52 (3): 329–360. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02823-6>
6. Baker J.S., McCormick M.C., Robergs R.A. Interaction among Skeletal Muscle Metabolic Energy Systems during Intense Exercise. *J. Nutr. Metab.* 2010; 2010: 905612. <https://doi.org/10.1155/2010/905612>
7. Hargreaves M., Spriet L.L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nat. Metab.* 2020; 2 (9): 817–828. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0251-4>
8. Lenney J.F., Peppers S.C., Kucera-Orallo C.M., George R.P. Characterization of human tissue carnosinase. *Biochem. J.* 1985; 228 (3): 653–660. <https://doi.org/10.1042/bj2280653>
9. Hamilton G., Middleton M.S., Bydder M. et al. Effect of PRESS and STEAM sequences on magnetic resonance spectroscopic liver fat quantification. *J. Magn. Reson. Imaging.* 2009; 30 (1): 145–152. <https://doi.org/10.1002/jmri.21809>
10. Rozhkova Z.Z., Kulchitsky O.K. Magnetic resonance spectroscopy (*in vivo* 1H MRS) in clinical neurology. *Int. Neurol. J.* 2016; 83 (5): 13–26. <https://doi.org/10.22141/2224-0713.5.83.2016>
11. Markley J.L. Biological Applications of Magnetic Resonance. Academic New York, 1979: 397–463. ISBN 978-0-12-640750-1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-126-40750-1.X5001-1>
12. Rabenstein D.L., Isab A.A. Determination of the intracellular pH of intact erythrocytes by 1H NMR spectroscopy. *Anal. Biochem.* 1982; 121: 423–432. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90502-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90502-4)
13. Yoshizaki K., Seo Y., Nishikawa H. High-resolution proton magnetic resonance spectra of muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1981; 678: 283–291. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(81\)90218-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(81)90218-X)
14. Arus C., Barany M. Application of high-field 1H-NMR spectroscopy for the study of perfused amphibian and excised mammalian muscles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1986; 886: 411–424. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(86\)90177-1](https://doi.org/10.1016/0167-4889(86)90177-1)
15. Gadian D.G., Proctor E., Williams S.R. Some recent applications of 1H NMR spectroscopy *in vivo*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1987; 508: 241–250. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb32908.x>
16. Williams S.R., Gadian D.G., Proctor E. Proton NMR studies of muscle metabolites *in vivo*. *J. Magn. Reson.* 1985; 63: 406–412. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(85\)90336-1](https://doi.org/10.1016/0022-2364(85)90336-1)
17. Hetherington H.P., Hamm J.R., Pan J.W. et al. A fully localized 1H homonuclear editing sequence to observe lactate in human skeletal muscle after exercise. *J. Magn. Reson.* 1969; 82: 86–96. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(89\)90167-4](https://doi.org/10.1016/0022-2364(89)90167-4)
18. Taylor D.J., Bore P.J., Styles P. et al. Bioenergetics of intact human muscle. A 31P nuclear magnetic resonance study. *Mol. Biol. Med.* 1983; 1: 77–94. PMID: 6679873
19. Just Kukurová I., Valkovič L., Ukropec J. et al. Improved spectral resolution and high reliability of *in vivo* (1) H MRS at 7 T allow the characterization of the effect of acute exercise on carnosine in skeletal muscle. *NMR Biomed.* 2016; 29 (1): 24–32. <https://doi.org/10.1002/nbm.3447>
20. Kapilevich L.V., Zakharova A.N., Kabachkova A.V. et al. Dynamic and Static Exercises Differentially Affect Plasma Cytokine Content in Elite Endurance- and Strength-Trained Athletes and Untrained Volunteers. *Front. Physiol.* 2017; 8: 35. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00035>
21. Kapilevich L.V., Yezhova G.S., Zakharova A.N. et al. Brain bioelectrical activity and cerebral hemodynamics in athletes under combined cognitive and physical loading. *Hum. Physiol.* 2019; 45: 64–173. <https://doi.org/10.1134/S0362119719010080>
22. Kushmerick M.J., Moerland T.S., Wiseman R.W. Mammalian skeletal muscle fibers distinguished by contents of phosphocreatine, ATP, and Pi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89 (16): 7521–7525. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7521>
23. Blancquaert L., Baba S.P., Kwiatkowski S. et al. Carnosine and anserine homeostasis in skeletal muscle and heart is controlled by β -alanine transamination. *J. Physiol.* 2016; 594 (17): 4849–4863. <https://doi.org/10.1073/10.1113/JP272050>
24. Kapilevich L.V., Kologrivova V.V., Zakharova A.N., Mourot L. Post-exercise Endothelium-Dependent Vasodilation Is Dependent on Training Status. *Front Physiol.* 2020; 11: 348. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00348>
25. Ortlepp J.R., Metrikat J., Albrecht M., Maya-Pelzer P. Relationship between physical fitness and lifestyle behaviour in healthy young men. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 2004; 11 (3): 192–200. <https://doi.org/10.1097/01.hjr.0000131578.48136.85>
26. Svannshvili R.A., Sopromadze Z.G., Kakhabrishvili Z.G. et al. Athletes' physical working capacity. *Georgian Med. News.* 2009; 166: 68–73. PMID: 19202224
27. Pan J.W., Hamm J.R., Rothman D.L. Intracellular pH in human skeletal muscle by 1H NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85 (21): 7836–7839. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.21.7836>
28. Pereyra A.S., Lin C.T., Sanchez D.M. et al. Skeletal muscle undergoes fiber type metabolic switch without myosin heavy chain switch in response to defective fatty acid oxidation. *Mol. Metab.* 2022; 59:101456. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101456>
29. Schröder L., Bachert P. Evidence for a dipolar-coupled AM system in carnosine in human calf muscle from *in vivo* 1H NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 2003; 164 (2): 256–269. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101456>
30. Boesch C., Kreis R. Dipolar coupling and ordering effects observed in magnetic resonance spectra of skeletal



- muscle. *NMR Biomedicine*. 2001; 14: 140–148. <https://doi.org/10.1002/nbm.684>
31. Yquel R.J., Arsac L.M., Thiaudière E. et al. Effect of creatine supplementation on phosphocreatine resynthesis, inorganic phosphate accumulation and pH during intermittent maximal exercise. *J. Sports Sci.* 2002; 20 (5): 427–437. <https://doi.org/10.1080/026404102317366681>
 32. Sale C., Saunders B., Harris R.C. Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance. *Amino Acids*. 2010; 39 (2): 321–333. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0443-4>
 33. Schnuck J.K., Sunderland K.L., Kuennen M.R., Vaughan R.A. Characterization of the metabolic effect of β -alanine on markers of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J. Exerc. Nutrition. Biochem.* 2016; 20 (2): 34–41. <https://doi.org/10.20463/jenb.2016.06.20.2>

Для корреспонденции*: Рябченкова Анастасия Андреевна – 199178 Санкт-Петербург, вн. тер. г. муниципальный округ Васильевский, пр-кт Малый В.О., д.57, к.4, литера Ж, помещение 5-Н, офис 1.2.5. ООО “АТГ Сервис Ген”. Тел.: +7-981-160-63-15. E-mail: riabchenkova@service-gene.ru

Берзин Игорь Александрович – доктор мед. наук, профессор, начальник управления организации научных исследований ФМБА России, Москва. <https://orcid.org/0000-0003-4147-8054>. E-mail: berzin27@yandex.ru

Рябченкова Анастасия Андреевна – научный сотрудник ООО “АТГ Сервис Ген”, Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-9973-0753>. E-mail: riabchenkova@service-gene.ru

Колмаков Николай Николаевич – канд. мед. наук, научный сотрудник ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-4672-6208>. E-mail: kolmakov@service-gene.ru

Зубков Михаил Александрович – PhD, старший научный сотрудник Национального исследовательского университета ИТМО, Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0003-0768-1737>

Богдан Андрей Александрович – канд. мед. наук, младший научный сотрудник, врач-рентгенолог ФГБУН “Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева Российской академии наук”, Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-2836-1516>. E-mail: andrey.a.bogdan@gmail.com

Копать Владимир Владиславович – директор по развитию ООО “АТГ Сервис Ген”, Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-6573-6743>. E-mail: kopat@service-gene.ru

Духовлинов Илья Владимирович – канд. биол. наук, директор по науке ООО “АТГ Сервис Ген”, Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-5268-9802>. E-mail: atg@service-gene.ru

Contact*: Anastasia A. Riabchenkova – 57, building 4, letter Zh, Maly prosp. V.O., St. Petersburg 199178, Russian Federation. Limited Liability Company ‘ATG Service Gene’. Phone: +7-981-160-63-15. E-mail: riabchenkova@service-gene.ru

Igor A. Berzin – Doct. of Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Scientific Research Organization at the FMBA of Russia, Moscow. <https://orcid.org/0000-0003-4147-8054>. E-mail: berzin27@yandex.ru

Anastasia A. Riabchenkova – Researcher, Limited Liability Company ‘ATG Service Gene’, Saint-Petersburg. <https://orcid.org/0000-0002-9973-0753>. E-mail: riabchenkova@service-gene.ru

Nikolai N. Kolmakov – Cand. of Sci. (Med.), Researcher, The Federal state budgetary scientific “Institution Institute of experimental medicine”, St. Petersburg. <https://orcid.org/0000-0002-4672-6208>. E-mail: kolmakov@service-gene.ru

Mikhail A. Zubkov – PhD, Senior researcher, Saint-Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg. <https://orcid.org/0000-0003-0768-1737>

Andrey A. Bogdan – Cand. of Sci. (Med.), junior researcher, radiologist, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg. <https://orcid.org/0000-0002-2836-1516>. E-mail: andrey.a.bogdan@gmail.com

Vladimir V. Kopat – Development Director, Limited Liability Company ‘ATG Service Gene’, St. Petersburg. <https://orcid.org/0000-0002-6573-6743>. E-mail: kopat@service-gene.ru

Ilya V. Dukhovlinov – Cand. Sci. (Biol.), Science director, Limited Liability Company ‘ATG Service Gene’, St. Petersburg. <https://orcid.org/0000-0002-5268-9802>. E-mail: atg@service-gene.ru