

## Роль мышечной ткани в патогенезе хронической сердечной недостаточности — возможности воздействия (исследование “ФОРМА”)

Леявина Т.А., Ситникова М.Ю., Галенко В.Л., Козлов П.С., Борцова М.А., Демченко Е.А., Ганенко О.С., Головкин А.С., Костарева А.А., Дмитриева Р.И.

**Цель.** 1) определить, сохраняет ли скелетная мускулатура пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) способность к регенерации и росту; 2) сопоставить эффективность длительных аэробных тренировок, рассчитанных индивидуализированным методом, и тренировок, рассчитанных традиционно, на основании значений  $VO_{2peak}$ , в отношении выраженности сердечной недостаточности, толерантности к физической нагрузке (ТФН), активности эргорефлекса (ЭРФ).

**Материал и методы.** В исследование включено 297 больных со стабильной ХСН III функционального класса (ФК), получающих оптимальную терапию. Наличие ХСН было установлено у всех пациентов как минимум за 6 мес. до начала исследования, возраст — 18-65 лет, индекс массы тела (ИМТ) —  $19-28 \text{ кг/рост, м}^2$ . Исходно исследуемые выполняли кардиореспираторный тест (КРТ) с оценкой показателей газового состава, кислотно-основного состояния крови, активности ЭРФ. Пациенты были рандомизированы на 2 группы: основная (ОГ) и контрольная (КГ). Для ОГ основанном определении лактатного порога (ЛаП), через 1 и 3 мес. КРТ повторяли и режим тренировочной ходьбы динамически пересчитывался по новому уровню ЛаП. Для КГ режим тренировочной ходьбы рассчитывался на основании значений  $VO_{2peak}$ . Все больные тренировались в течение 6 мес. По окончании тренировок выполнялся диагностический КРТ, оценивалась активность ЭРФ. 11 больных ХСН и 3 здоровым донорам до начала тренировок выполнена биопсия икроножной мышцы.

**Результаты.** Показано, что потенциал к мышечной дифференцировке сателлитных клеток-предшественников скелетной мускулатуры, полученных от больных с сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса (СННФВ), не отличается *in vitro* (в пробирке) от потенциала сателлитных клеток здоровых доноров. Через 6 мес. тренировок выраженность ХСН уменьшилась до II ФК у 75% пациентов ОГ, а среди пациентов КГ — у 44%; основные показатели этапов включения компенсаторных механизмов при физической нагрузке ( $VO_{2LП}$  и  $VO_{2peak}$ ) в ОГ повысились в большей степени, чем в КГ ( $10,8 \pm 0,4$ ,  $18,7 \pm 0,7 \text{ мл/мин/кг}$  и  $9,5 \pm 0,8$ ,  $15,3 \pm 0,9 \text{ мл/мин/кг}$ , при  $p_1 < 0,01$ ,  $p_2 < 0,05$ ,  $p_3 < 0,01$ , соответственно).

**Заключение.** 1) *In vitro* потенциал к мышечной дифференцировке, регенерации и росту сателлитных клеток-предшественников скелетной мускулатуры, полученных от больных СННФВ, не отличается от потенциала сателлитных клеток здоровых доноров; 2) аэробные тренировки у больных ХСН III ФК рассчитанные на основании определения ЛаП, по безопасности не уступают результатам тренировочной ходьбы, который рассчитывался по уровню  $VO_{2peak}$ ; 3) аэробные тренировки у больных ХСН III ФК рассчитанные на основании определения ЛаП, по сравнению с обычным режимом тренировочной ходьбы, достоверно снижают активность эргорефлекса, повышают ТФН, уменьшают выраженность ХСН; 4) тренировочная ходьба более 1,5 ч/сут., режим которой был определен по уровню ЛаП, у пациентов с ХСН III ФК способствует развитию физиологического обратного ремоделирования миокарда в большей степени, чем аэробные тренировки, которые рассчитывались традиционным методом.

**Ключевые слова:** сердечная недостаточность, длительные аэробные тренировки, эргорефлекс, инверсия ремоделирования миокарда, сателлитные стволовые клетки скелетной мускулатуры, регенерация мышечной ткани.

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Финансирование.** Работа частично выполнена при поддержке гранта РНФ № 16-15-1017.

ФГБУ НИИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия.

Леявина Т.А.\* — в.н.с. Научно-исследовательского отдела сердечной недостаточности, ORCID: 0000-0001-6796-4064, Ситникова М.Ю. — руководитель Научно-исследовательского отдела сердечной недостаточности, ORCID: 0000-0002-0139-5177, Галенко В.Л. — врач-кардиолог, ORCID: 0000-0002-0503-167X, Козлов П.С. — врач функциональной диагностики, ORCID: 0000-0001-5886-7908, Борцова М.А. — зав. кардиологическим отделением, ORCID: 0000-0002-9694-7850, Демченко Е.А. — руководитель Научно-исследовательского отдела реабилитологии, ORCID: 0000-0002-0009-9106, Ганенко О.С. — зав. отделением лечебной физкультуры, ORCID: 0000-0001-7989-3785, Головкин А.С. — н.с. института молекулярной биологии и генетики, ORCID: 0000-0002-7577-628X, Костарева А.А. — директор института молекулярной биологии и генетики, ORCID: 0000-0002-9349-6257, Дмитриева Р.И. — н.с. института молекулярной биологии и генетики, ORCID: 0000-0002-3073-7914.

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):  
tatianalelyavina@mail.ru

бета-АБ — бета-адреноблокаторы, CD56 — невральный молекула межклеточной адгезии 1, маркер миогенной коммитированности, CD73 — Экто-5'-нуклеотидаза NT5E, CD166 — молекула клеточной адгезии CD166, CD140a — альфа-рецептор тромбоцитарного фактора роста, CD140b — бета-рецептор тромбоцитарного фактора роста, CD146 — кластер дифференцировки 146, CD45 — дифференцировочный антиген CD45, DMEM — модифицированная культуральная среда,  $\alpha$ -MEM — базовая культуральная среда, Myf5 — регулятор миогенеза, Mfn1 — митофузин, PAX7 — фактор транскрипции, регулирующий миогенез, PE-RCO — метод постнагрузочной региональной циркуляторной окклюзии,  $VO_{2peak}$  — объем кислорода, поглощенного на пике физической нагрузки,  $VE/VCO_2$  — вентиляционный эквивалент по углекислоте,  $V_E$  — объемом минутной вентиляции, АД — артериальное давление, АКШ — аортокоронарное шунтирование, АМКР — антагонисты минералокортикоидных рецепторов, АРА — антагонисты рецепторов к ангиотензину II, АРНИ — ангиотензина рецепторов и непрямого ингибиторы, ДАД — диастолическое артериальное давление, иАПФ — ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, ИМТ — индекс массы тела, КГ — контрольная группа, ЛаП — лактатный порог, ЛП — левое предсердие, кДНК — комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота, КДРлж — конечно-диастолический размер левого желудочка, КСРлж — конечно-систолический размер левого желудочка, МНС MF-20 — антитела MF20 к тяжелой цепи миозина, мРНК — матричная РНК, ОГ — основная группа, ОГоб — группа обычных тренировок на уровне ЛаП, ОГдлит — группа длительных тренировок на уровне ЛаП, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РНК — рибонуклеиновая кислота, ТФН — толерантность к физической нагрузке, ФВлж — фракция выброса левого желудочка, ФП — фибрилляция предсердий, ФР — физическая реабилитация, ХСН — хроническая сердечная недостаточность, ЧСС — частота сердечных сокращений, ЭР — эргорецепторы, ЭРФ — эргорефлекс.

Рукопись получена 19.03.2019

Рецензия получена 23.05.2019

Принята к публикации 30.05.2019



**Для цитирования:** Леявина Т.А., Ситникова М.Ю., Галенко В.Л., Козлов П.С., Борцова М.А., Демченко Е.А., Ганенко О.С., Головкин А.С., Костарева А.А., Дмитриева Р.И. Роль мышечной ткани в патогенезе хронической сердечной недостаточности — возможности воздействия (исследование “ФОРМА”). *Российский кардиологический журнал*. 2019;24(10):58-65  
doi:10.15829/1560-4071-2019-10-58-65

## The role of muscle tissue in the pathogenesis of chronic heart failure — the potential of exposure (FORMA study)

Lelyavina T. A., Sitnikova M. Yu., Galenko V. L., Kozlov P. S., Bortsova M. A., Demchenko E. A., Ganenko O. S., Golovkin A. S., Kostareva A. A., Dmitrieva R. I.

**Aim.** To determine whether the skeletal muscle of patients with chronic heart failure (CHF) retains the ability to regenerate and grow; to compare the effectiveness of long aerobic trainings, calculated by an individualized method, and conventionally calculated trainings ( $\text{VO}_{2\text{peak}}$  values), in relation to the severity of heart failure, exercise tolerance (ET), and ergoreflex activity (ERGO).

**Material and methods.** The study included 297 patients with stable III functional class (FC) CHF, receiving optimal therapy. The presence of heart failure was found in all patients at least 6 months before the start of the study (age — 18-65 years, body mass index (BMI) — 19-28 kg/height,  $\text{m}^2$ ). Initially, the study performed a cardiorespiratory test (CRT) with an assessment of gas composition, acid-base balance of the blood and ERGO activity. Patients were randomized into 2 groups: experimental (EG) and control (CG). For EG, based on the determination of the lactate threshold (LT), after 1 and 3 months the CRT was repeated and the training walking mode was dynamically recounted according to the new LT level. For CG, the training walking mode was calculated based on the  $\text{VO}_{2\text{peak}}$  values. All patients trained for 6 months. At the end of the training, diagnostic CRT was performed, and the activity of EGO was evaluated. Eleven patients with CHF and 3 healthy donors before the start of the training underwent a biopsy of the gastrocnemius muscle.

**Results.** It was shown that the potential for muscle differentiation of satellite skeletal muscle precursor cells obtained from patients with CHF with a reduced ejection fraction (HFrEF) does not differ *in vitro* from the potential of satellite cells of healthy donors. After 6 months of training, the severity of CHF decreased to FC II in 75% of EG patients, and among CG patients — in 44%; the main indicators of the stages of compensatory mechanisms activation during physical exertion ( $\text{VO}_{2\text{LT}}$  and  $\text{VO}_{2\text{peak}}$ ) in EG increased more than in the CG ( $10.8 \pm 0.4$ ,  $18.7 \pm 0.7$  ml/min/kg and  $9.5 \pm 0.8$ ,  $15.3 \pm 0.9$  ml/min/kg, with  $p_1 < 0.01$ ,  $p_2 < 0.05$ ,  $p_3 < 0.01$ , respectively).

**Conclusion.** *In vitro*, the potential for muscle differentiation, regeneration and growth of satellite skeletal muscle precursor cells obtained from patients with HFrEF does not differ from the potential of satellite cells of healthy donors. Aerobic training in patients with III FC chronic heart failure calculated by definition of LT, relating to safety is not worse than the results calculated by the level of  $\text{VO}_{2\text{peak}}$ . Aerobic

training in patients with III FC chronic heart failure calculated by definition of LT, compared with the usual mode of training walking, significantly reduce the activity of ergoreflex, increase ET, reduce the severity of CHF. In patients with III FC CHF, training walking for more than 1.5 hours/day determined by the level of LT, contributes to the development of physiological reverse myocardial remodeling to a greater extent than aerobic training calculated by the conventional method.

**Key words:** heart failure, long aerobic training, ergoreflex, inversion of myocardial remodeling, skeletal muscle satellite cells, muscle tissue regeneration.

**Conflicts of Interest:** nothing to declare.

**Funding.** This study was partially supported by the Russian Science Foundation grant № 16-15-1017.

Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia.

Lelyavina T. A. ORCID: 0000-0001-6796-4064, Sitnikova M. Yu. ORCID: 0000-0002-0139-5177, Galenko V. L. ORCID: 0000-0002-0503-167X, Kozlov P. S. ORCID: 0000-0001-5886-7908, Bortsova M. A. ORCID: 0000-0002-9694-7850, Demchenko E. A. ORCID: 0000-0002-0009-9106, Ganenko O. S. ORCID: 0000-0001-7989-3785, Golovkin A. S. ORCID: 0000-0002-7577-628X, Kostareva A. A. ORCID: 0000-0002-9349-6257, Dmitrieva R. I. ORCID: 0000-0002-3073-7914.

**Received:** 19.03.2019 **Revision Received:** 23.05.2019 **Accepted:** 30.05.2019

**For citation:** Lelyavina T. A., Sitnikova M. Yu., Galenko V. L., Kozlov P. S., Bortsova M. A., Demchenko E. A., Ganenko O. S., Golovkin A. S., Kostareva A. A., Dmitrieva R. I. The role of muscle tissue in the pathogenesis of chronic heart failure — the potential of exposure (FORMA study). *Russian Journal of Cardiology*. 2019;24(10):58–65  
doi:10.15829/1560-4071-2019-10-58-65

Распространенность хронической сердечной недостаточности (ХСН) в Российской Федерации достигла масштабов эпидемии [1, 2]. Силами доказательной медицины разработаны эффективные методы борьбы с данной патологией, включающие базовые медикаментозные препараты: ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ), антагонисты рецепторов к ангиотензину II (АРА), ангиотензина рецепторов и неприлизина ингибиторы (АРНИ), бета-адреноблокаторы (бета-АБ), антагонисты минералокортикоидных рецепторов (АМКР), тем не менее, по настоящее время не удается остановить стремительный рост числа регоспитализаций, связанных с декомпенсацией СН, что ложится тяжелым бременем на экономику всех стран.

Несмотря на ингибирующее действие β-АБ, иАПФ, АРА, АРНИ, АМКР, нейрогуморальная активация при ХСН постоянно повышена вследствие непрерывной стимуляции со стороны периферических афферентных волокон, располагающихся в ске-

летной мускулатуре, т.е. вследствие возрастания активности эргорефлекса (ЭРФ).

Одной из возможных точек приложения в стабилизации течения ХСН, является поперечно-полосатая мышечная ткань. Стимуляция молекулярных механизмов реализации потенциала регенерации скелетных мышц, в том числе и при выполнении программ физической реабилитации, является перспективной стратегией снижения мышечных дисфункций, поэтому представляется актуальным определить, сохраняет ли скелетная мускулатура пациентов с ХСН способность к регенерации и росту. Сведений о подобных исследованиях в доступной литературе не найдено.

Как и любой орган или ткань при сердечной недостаточности, скелетная мускулатура также страдает от недостатка кислорода и питательных веществ. Отличия заключаются в том, что — первое, мышечная ткань является самым крупным по массе органом человека — 40-45% массы тела, и второе — в наличии

особой обратной связи между каждым мышечным волокном и центральной нервной системой (ЦНС) — ЭРФ.

Между скелетной мускулатурой с одной стороны и сосудодвигательным и дыхательным центрами головного мозга с другой стороны существуют нейрогенные связи, которые опосредуются эргорецепторами (ЭР). ЭР — это миелиновые и безмиелиновые афферентные нервные волокна, расположенные в скелетной мускулатуре и чувствительные ко всем механическим и метаболическим изменениям, возникающим в мышечных волокнах. ЭР играют основную роль в обратном контроле для поддержания соответствия между интенсивностью нагрузки, выполняемой мышцами, и энергией, обеспечивающей работу мышц. Эргорефлекс — защитная реакция организма на накопление метаболитов в мышечном волокне, направленная на удаление метаболитов и усиление аэробного окисления. Реагируя на метаболическое состояние мускулатуры, эргорецепторы модулируют интенсивность кровотока в мышцах и кардиореспираторный ответ на физическую нагрузку с целью обеспечения метаболических потребностей сокращающихся мышц, т.е. происходит усиление вентиляции и ряд циркуляторных изменений, обусловленных повышением активности симпатической нервной системы (СНС) — увеличение частоты сердечных сокращений (ЧСС), артериального давления (АД), сокращение резистивных сосудов неработающих мышц (рис. 1).

Таким образом, скелетная мускулатура является не только самым крупным по массе органом человеческого организма, но и органом, контролирующим деятельность сердечно-сосудистой и легочной систем посредством ЭРФ (рис. 1), однако сведения об эффективных методах воздействия на нее в настоящий момент весьма разноречивы. Единственный и самый физиологичный способ снижения активности ЭРФ — физические тренировки (ФТ).

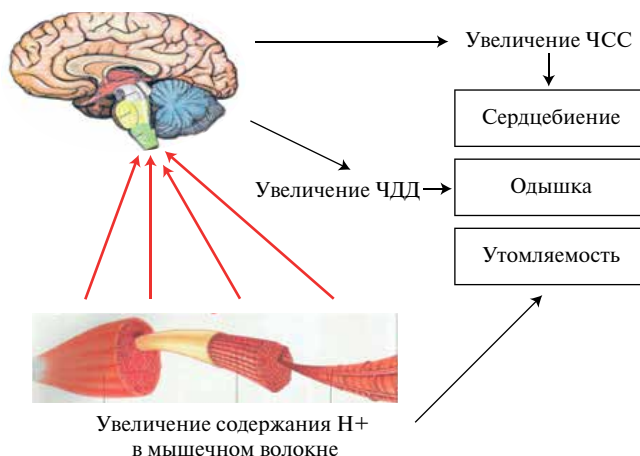


Рис. 1. Роль мышечной ткани в патогенезе ХСН.

Физическая реабилитация (ФР) у больных ХСН должна применяться с целью повышения толерантности к физической нагрузке, улучшения качества жизни, снижения количества госпитализаций по поводу декомпенсации ХСН [1, 2]. Тем не менее, в настоящее время существуют трудности, связанные с индивидуальным подбором вида, продолжительности, интенсивности физической нагрузки у больных ХСН.

Цели исследования: 1) определить, сохраняет ли скелетная мускулатура пациентов с ХСН способность к регенерации и росту; 2) сопоставить эффективность длительных аэробных тренировок, рассчитанных индивидуализированным методом, и тренировок, традиционно рассчитанных на основании значений объема кислорода, поглощенного на пике физической нагрузки ( $VO_{2peak}$ ), в отношении выраженности ХСН, толерантности к физической нагрузке, активности эргорефлекса.

### Материал и методы

**Биопсия икроножной мышцы и оценка состояния резидентных клеток мышечной ткани.** У 11 больных ХСН, средний возраст —  $54 \pm 12,5$  года, индекс массы тела (ИМТ)  $26,5 \pm 6,4$  кг/м<sup>2</sup>, ФВлж  $26,4 \pm 1,4\%$  и 3 здоровых доноров была взята биопсия икроножной мышцы. Получение первичных культур резидентных клеток мышечной ткани, обогащенных фракцией сателлитных клеток, выполняли согласно методикам [3]. Обработку культуральной посуды проводили в течение 1,5 ч в культуральном CO<sub>2</sub> инкубаторе при +37° С раствором Geltrex (Invitrogen, США) в модифицированной культуральной среде (DMEM) в соотношении 1:100. Культуральную среду меняли через день. Миогенную дифференцировку клеток производили согласно методикам [3, 4] при культивировании в дифференцировочной среде, состоящей из базовой культуральной питательной среды ( $\alpha$ -MEM) (ПанЭко, Россия) с добавлением 1% L-глутамин (Invitrogen, США), 1% антибиотика Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, США) и 2% лошадиной сыворотки (Gibco, США). Замену первичной среды на дифференцировочную производили, когда клетки достигали субконфлюентного состояния. Иммуноцитохимия: клетки отмывали фосфатным буфером и фиксировали 4% параформальдегидом при +4° С в течение 10-15 мин, отмывали фосфатным буфером, в течение 5 мин инкубировали с 0,2% раствора TRITONx100, отмывали фосфатным буфером, блокировали 30 мин 15% раствором эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) в фосфатном буфере. Инкубацию с первичными и вторичными антителами проводили согласно инструкции производителя (анти-тела MF20 к тяжелой цепи миозина (МНС MF20), регулятор миогенеза (Myf5), митофузин (Mfn1), фактор транскрипции, регулирующий миогенез (PAX),

Таблица 1

## Характеристика исследованных больных

Признак	Основная группа			Контрольная группа	Р			
	ОГ	ОГоб	ОГдлит		ОГ и КГ	ОГоб и ОГдлит	ОГоб и КГ	ОГдлит и КГ
Демографические характеристики								
Общее число больных ХСН, n	237	182	55	60				
Возраст, лет, M±m	53,1±4,2	52,3±5,0	57,3±6,5	51,0±6,1	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05
Мужчины, n (%)	176 (75)	133 (75)	52 (93)	36 (60)	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> , M±m	27,5±0,5	27,0±0,9	28,1±1,3	26,2±2,8	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05
Этиология сердечной недостаточности								
ИБС, n (%)	158 (67)	129 (70)	29 (53)	35 (58)	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05
ДКМП, n (%)	79 (33)	53 (30)	26 (47)	25 (42)	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05
Сопутствующая патология								
ФП, n (%)	29 (12)	22 (13%)	7 (11%)	6 (10%)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Анемия, n (%)	12 (5)	10 (5%)	2 (4%)	5 (8%)	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05
ХОБЛ, n (%)	85 (36)	67 (35%)	18 (30%)	24 (40%)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Высокотехнологичные методы лечения								
СРТ, n (%)	52 (22)	41 (23%)	11 (20%)	9 (15%)	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05
АКШ, n (%)	73 (30)	61 (34%)	12 (23%)	19 (28%)	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Фракция выброса левого желудочка								
ФВлж, %	30±1,3	29±1,5	30±3,5	32±3,3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Медикаментозная терапия, максимально переносимые дозы								
иАПФ/АРА/АРНИ, n (%)	237 (100)	182 (100)	55 (100)	60 (100)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
β-адреноблокаторы, n (%)	237 (100)	182 (100)	55 (100)	60 (100)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
АМКР, n (%)	212 (90)	163 (90)	51 (93)	54 (91)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Диуретическая терапия								
Диуретики, n (%)	237 (100)	182 (100)	55 (100)	60 (100)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

**Сокращения:** ИМТ — индекс массы тела, ФП — фибрилляция предсердий, ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких, СРТ — сердечная ресинхронизирующая терапия, АКШ — аортокоронарное шунтирование, ФВлж — фракция выброса левого желудочка, КГ — контрольная группа, ОГ — основная группа, ОГоб — обычный режим индивидуализированной физической реабилитации, ОГдлит — группа добровольных длительных тренировок.

R&D BioSystems, США). Иммунофенотип клеток подтверждали методом проточной цитометрии с использованием прибора CytoFLEX (Beckman Coulter). Данные анализировали с использованием программного обеспечения CytExpert 2.0 (Beckman Coulter).

**Выделение рибонуклеиновой кислоты (РНК), синтез комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени.** Общая РНК была выделена с использованием реагента ExtractRNA (Evrogen, cat.no BC032, Россия). кДНК была синтезирована из 500 нг общей РНК с использованием набора для обратной транскрипции (Molove, SK021, Россия). Количественную оценку экспрессии генов проводили с использованием смеси qPCR-HS SYBR + ROX (Evrogen, cat.no. PK156, Russia). Данные Q-PCR представлены как произвольные единицы экспрессии мРНК, нормированные на экспрессию GAPDH, и уровни экспрессии в эталонном образце.

**Статистический анализ** данных выполняли с использованием программного обеспечения GraphPadPrism7. Все данные были проанализированы, по крайней мере, тремя биологическими повторами и представлены как среднее значение + SEM.

**Исследование безопасности и эффективности разных методов тренировок** было проведено в рамках исследования “ФОРМА” — Физиологическое Обратное Ремоделирование Миокарда. Проспективное, рандо-мизированное исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинской декларации, протокол исследования был одобрен этическим комитетом ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова. Критерии включения: симптомы ХСН III ФК, стабильное клиническое состояние в течение как минимум 2 нед. до момента включения в исследование, возраст — 18-65 лет, индекс массы тела (ИМТ) — 19-28 кг/м<sup>2</sup>, подписанное информированное согласие на участие в исследовании, способность выполнить КРТ, показатели фракции выброса левого желудочка (ФВлж) <45%, медикаментозная терапия, включающая ингибиторы АПФ/АРА/АРНИ, β-адреноблокаторы, АМКР, диуретики, обучение в школе для больных ХСН в период госпитализации в ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова, диспансерное наблюдение кардиологом-специалистом по сердечной недостаточности. Критерии не-включения — хроническая обструктивная болезнь



Таблица 2

## Ход исследования ФОРМА

Исходно	1 мес.	3 мес.	6 мес.
Выполнение КРТ	+	+	+
Выполнение ЭхоКГ	+		+
Оценка ЭРФ	+		+
Оценка ФК ХСН	+	+	+
Оценка нежелательных явлений	+	+	+

легких (ХОБЛ) средней и тяжелой степени, инфаркт миокарда (ИМ) и тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА), оперативные вмешательства, перенесенные в течение последних 6 мес., выраженные интеллектуально-мнестические нарушения, низкий комплайнс.

Конечными точками исследования являлись: изменения выраженности ХСН (ФК), толерантности к физической нагрузке ( $VO_{2peak}$ ), сократительной функции миокарда: фракции выброса левого желудочка (ФВлж), конечно-диастолического размера левого желудочка (КДР), конечно-систолического размера левого желудочка (КСР), активности ЭРФ.

**Характеристика пациентов.** В исследование было включено 297 больных стабильной ХСН III ФК, которая была установлена как минимум за 6 мес. до исследования. Пациенты случайным образом были разделены на две группы: основная группа (ОГ) — 237 больных ХСН III ФК, возраст — 18–65 лет, индекс массы тела (ИМТ) — 19–28 кг/рост, м<sup>2</sup>, и контрольная группа (КГ) — 60 больных ХСН III ФК, возраст — 18–65 лет, индекс массы тела (ИМТ) — 19–28 кг/рост, м<sup>2</sup>. Через 4–6 нед. после начала тренировок 55 больных ОГ по собственной инициативе постепенно увеличивали продолжительность ежедневной ходьбы до 1,5–2 ч, эта подгруппа добровольных длительных тренировок (ОГдлит) была выделена для дополнительного анализа (табл. 1).

Терапия больных в исследуемых группах существенно не различалась. Клинико-инструментальные данные исследованных больных представлены в таблице 1.

Ход исследования представлен в таблице 2. Исходно исследуемые выполняли субмаксимальный кардиореспираторный тест (КРТ) с одновременной оценкой показателей газового состава, кислотно-основного состояния крови (табл. 2).

Для каждого больного основной группы по результатам КРТ рассчитывали режим тренировочной ходьбы на основании определения лактатного порога (ЛаП), через 1 и 3 мес. КРТ повторяли и на основании вновь полученных показателей ЛаП режим тренировочной ходьбы пересчитывали, скорость ходьбы составляла 95% от скорости ходьбы на уровне ЛаП [5, 7]. Пациенты тренировались в течение 6 мес. По окончании тренировок выполнялся диагностический КРТ.

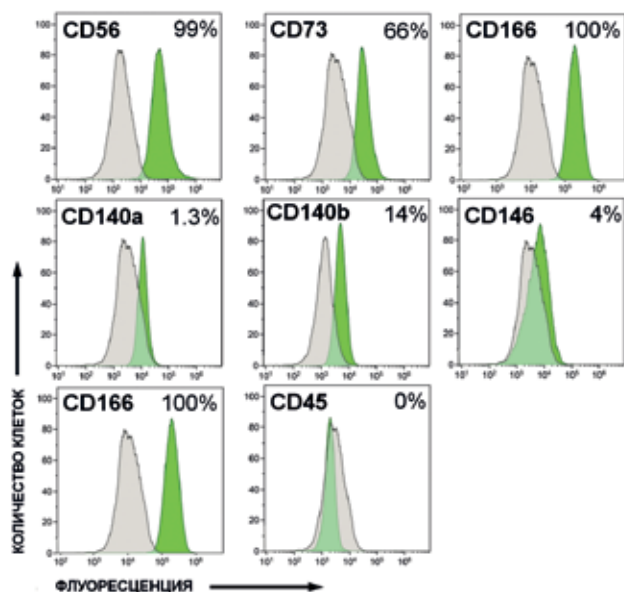
Больные КГ, согласно существующим рекомендациям, выполняли тренировочную ходьбу на уровне 55%  $VO_{2peak}$  3 раза/нед. Эхокардиография проводилась на аппарате Philips iE-33. Использовали одно- и двумерный режим сканирования, с помощью которых определяли: поперечный размер левого предсердия (ЛП), конечно-диастолический и конечно-систолический размеры ЛЖ, ФВлж. Кардиореспираторный тест выполняли на беговой дорожке модели GE Medical Systems Information Technologies с использованием аппаратуры Oxycon Pro (Jeger, Германия) по протоколу с непрерывно возрастающей физической нагрузкой (ФН) с увеличением мощности на 7 Вт каждые 30 сек по стандартному протоколу.

**Исследование содержания лактата венозной крови в покое и при физической нагрузке.** Перед проведением КРТ исследуемым устанавливался катетер в локтевую вену. Заборы крови осуществляли исходно и каждую мину во время выполнения ФН. Содержание лактата венозной крови оценивали на портативном газоанализаторе i-STAT (Abbott, USA) с помощью наборов картриджей CG4. ЛаП фиксировали в момент начала увеличения содержания лактата в крови [5–7]. Исследование эргорефлекса проводили методом постнагрузочной региональной циркуляторной окклюзии (PE-RCO) [8]. Во время выполнения теста измеряли диастолическое артериальное давление (ДАД), регистрировали вентиляцию и показатели газообмена. Рассчитывали разницу между ДАД, вентиляторным эквивалентом по углекислоте ( $VE/VCO_2$ ), объемом минутной вентиляции ( $V_E$ ) после трехминутной окклюзии (+PE-RCO) и на фоне восстановительного периода без окклюзии (–PE-RCO), вычисляли процентное соотношение этих величин.

**Статистический анализ** данных выполняли с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Все данные были проанализированы, по крайней мере, тремя биологическими повторами и представлены как среднее значение  $\pm$  SEM. Сравнение средних показателей проводили с помощью непараметрических методов статистики с использованием критерия Манна-Уитни. Использовался  $\chi^2$ -критерий и критерий Фишера для выявления достоверности по таблицам сопряженности. Критерием достоверности служило значение  $p < 0,05$ .

## Результаты

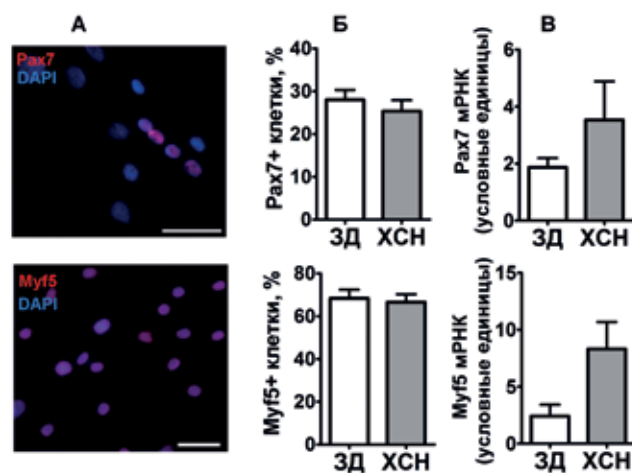
**Изучение популяции стволовых клеток, полученной в результате исследования биоптатов поперечно-полосатой мускулатуры.** После выделения клеток и нескольких дней экспансии *in vitro* мы проанализировали экспрессию поверхностных маркеров: CD56, CD105, CD166, CD146, CD73, CD140a, CD140b; CD45 использовали в качестве отрицательного контроля (рис. 2). Мы показали, что подавляющее большинство популя-



**Рис. 2.** Результаты иммунофенотипирования сателлитных клеток, выделенных из скелетной мускулатуры человека и культивированных *in vitro*.

**Примечание:** репрезентативные гистограммы представляют иммунофенотип полученных клеток ( $n=3$  в каждой группе).

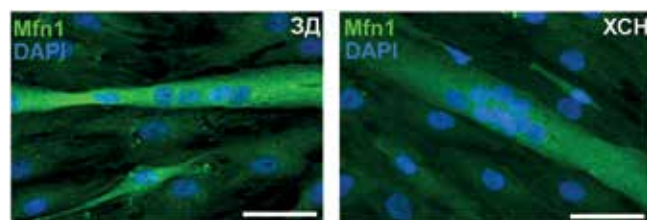
ции выделенных клеток было положительно по маркеру сателлитных клеток CD56 и отрицательно по маркеру гемопоэтических клеток CD45. Также мы обнаружили, что существенная фракция клеток экспрессирует стромальные маркеры CD105, CD166 и CD73, и лишь небольшая фракция клеток была положительна по маркерам CD146, CD140a и CD140b. Высокий уровень экспрессии стромальных маркеров в популяции скорее всего был связан с загрязнением фракции сателлитных клеток фракцией стромальных клеток мышечной ткани, поэтому было проведено иммуноцитохимическое исследование полученных образцов, которое подтвердило экспрессию маркеров сателлитных клеток Pax7 и Myf5 в полученных клеточных образцах (рис. 3А). Результаты количественного анализа иммуноцитохимического окрашивания и экспрессии мРНК маркеров сателлитных клеток и миоцитов показаны на рисунке 3. Уровень экспрессии мРНК как Myf5, так и Pax7 был достаточно высоким и не различался достоверно между образцами, полученными от здоровых доноров и пациентов с ХСН. Не различался существенно в образцах и процент Myf5+ и Pax7+ клеток. Результаты стимуляции дифференцировки полученных клеточных образцов показали, что и клетки полученные от здоровых доноров, и клетки полученные от пациентов с ХСН обладают сходным потенциалом к мышечной дифференцировке *in vitro*. На рисунке 4 показаны митотрубки, полученные после стимуляции мышечной дифференцировки *in vitro* образцов сателлитных клеток, от здоровых доноров и пациентов с ХСН. Коэффициент слияния не различался существенно между группами и состав-



**Рис. 3 (А, Б, В).** Анализ экспрессии маркеров сателлитных клеток Pax7 и Myf5.

**Примечание:** А. Иммуногистохимическое окрашивание подтвердило экспрессию маркеров Pax7 и Myf5 в выделенной популяции. Представлены репрезентативные фотографии. Масштабная линия соответствует 50 мкм; Б. Результаты количественного анализа иммуногистохимического окрашивания; В. Результаты анализа экспрессии мРНК Pax7 и Myf5 методом ПЦР в реальном времени.

**Сокращения:** ЗД — здоровые доноры, ХСН — пациенты с сердечной недостаточностью.



**Рис. 4.** Иммуноцитохимическое окрашивание дифференцированных миотрубок.

**Примечание:** представлены репрезентативные фотографии. Масштабная линия соответствует 50 мкм; миотрубки визуализированы антителами к митохондриям.

**Сокращения:** ЗД — здоровые доноры, ХСН — пациенты с сердечной недостаточностью.

лял  $19 \pm 7\%$  и  $23 \pm 5\%$  в образцах ЗД и ХСН, соответственно.

**Сопоставление безопасности и эффективности рутинного и индивидуализированного подходов в составлении режима физической реабилитации.** Из 297 больных 25 человек выбыли из исследования: 8 пациентов — из основной группы, 17 — из контрольной ( $p < 0,05$ ); причинами чего являлись: нежелание продолжать тренировки (10 человек), у 6 — трансплантация сердца, у 4 — госпитализация по причинам, не связанным с ХСН, у 3 — госпитализация, связанная с декомпенсацией ХСН на фоне ОРВИ. Таким образом, завершили исследование в ОГ — 229 человек, в КГ — 43 человека.

Через 6 мес. тренировок выраженность ХСН уменьшилась до II ФК у 75% пациентов ОГ, а среди пациентов КГ — у 44%; основные показатели этапов включения компенсаторных механизмов при ФН ( $VO_{2LП}$  и  $VO_{2peak}$ ) в ОГ повысились в большей сте-

Таблица 3

## Показатели активности ЭРФ у больных ХСН III ФК до и после тренировок

Показатель	Исходно			После 6 мес. тренировок		
	ОГ	КГ	p	ОГ	КГ	p
Изменения ДАД, мм рт.ст., %	86,5	89,7	>0,05	56,2	72,1	<0,001
Изменения $V_E$ , л/мин, %	93,8	92,7	>0,05	48,5	69,5	<0,001
Изменения $V_E/VCO_2$ , %	33,9	32,2	>0,05	20,7	28,2	<0,001

Примечание: p — достоверность различий показателей КРТ у больных ХСН до и после тренировок.

Сокращения: ДАД — диастолическое артериальное давление,  $V_E$  — объем минной вентиляции,  $V_E/VCO_2$  — вентиляторный эквивалент по углекислому газу.

Таблица 4

## Показатели ЭхоКГ у больных ХСН III ФК до и после тренировок

Показатель	ЛП, см		КДРлж, см		КСРлж, см		ФВлж, %	
	До ФР	После ФР	До ФР	После ФР	До ФР	После ФР	До ФР	После ФР
ОГ	5,52±0,09	5,31±0,05*	6,37±0,08	6,10±0,09**	5,91±0,12	5,68±0,08*	30±1,3	39±1,7**
ОГоб	5,51±0,22	5,33±0,05*	6,39±0,15	6,13±0,11**	5,95±0,18	5,75±0,11*	29±1,5	37±2,1*
ОГдлит	5,54±0,29	5,25±0,05**	6,36±0,19	6,05±0,28**	5,93±0,30	5,55±0,18**	30±3,5	41±2,9**
КГ	5,46±0,38	5,41±0,35	6,32±0,37	6,27±0,25	5,91±0,32	5,87±0,29	32±3,3	36±4,1*

Примечание: p — достоверность различий: \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,001$ .

Сокращения: ФР — физическая реабилитация, ЛП — левое предсердие, КДРлж — конечно-диастолический размер левого желудочка, КСРлж — конечно-систолический размер левого желудочка, ФВлж — фракция выброса левого желудочка, ОГ — основная группа, ОГоб — группа обычных тренировок на уровне ЛП, ОГдлит — группа длительных тренировок на уровне ЛП, КГ — контрольная группа.

пени, чем в КГ ( $10,8 \pm 0,4$ ,  $18,7 \pm 0,7$  мл/мин/кг и  $9,5 \pm 0,8$ ,  $15,3 \pm 0,9$  мл/мин/кг, при  $p_1 < 0,01$ ,  $p_2 < 0,05$ ,  $p_3 < 0,01$ , соответственно).

После проведения тренировок у больных ОГ зарегистрировано более выраженное, по сравнению с больными КГ, снижение активности ЭРФ: по уровню ДАД на 40%, по  $V_E$  — в ОГ на 53%, по  $V_E/VCO_2$  — на 38%, а в КГ — на 21%, 23% и 15%, соответственно ( $p < 0,05$ ) (табл. 3).

В таблице 4 представлены данные об изменении показателей ЭхоКГ у исследуемых больных до и после проведения физической реабилитации. В ОГ достоверно улучшились КДРлж, КСРлж, ФВлж, размеры левого предсердия. В контрольной группе выявлено достоверное увеличение ФВлж, размеры ЛП, КСРлж, КДРлж изменились недостоверно. На фоне длительных аэробных тренировок у пациентов из подгруппы ОГдлит выявлено выраженное достоверное уменьшение конечных систолического и диастолического объемов левого желудочка, размеров левого предсердия, а также более выраженное, чем в КГ и ОГоб, достоверное увеличение фракции выброса левого желудочка (табл. 4).

## Обсуждение

При ХСН системные метаболические изменения сопровождаются потерей мышечной массы, что в свою очередь вызывает снижение физической работоспособности и ухудшение качества жизни [1, 2, 5-6].

Целью первой части этого проекта было определить, сохраняет ли скелетная мускулатура пациентов с ХСН способность к регенерации и росту. Результаты исследования продемонстрировали, что поперечно-полоса-

тые мышечные клетки пациентов с ХСН III ФК не имеют существенных различий с клетками, полученными от здоровых доноров, обладают сходным потенциалом мышечной дифференцировки *in vitro* и демонстрируют высокий потенциал относительно восстановления клеток-предшественников мышечной ткани.

Таким образом, сателлитные клетки-предшественники скелетной мускулатуры при благоприятных обстоятельствах могут способствовать восстановлению поврежденных вследствие ХСН мышц. Точные молекулярные механизмы восстановления скелетной мускулатуры при ХСН еще предстоит исследовать, но очевидно, что новые терапевтические стратегии должны быть направлены на активацию потенциала регенерации сателлитных клеток, что, возможно, частично реализуется и в ходе ФР.

Результаты применения различных режимов тренировок отражены во второй части настоящего исследования. В 2017г были опубликованы российские рекомендации по назначению физических тренировок пациентам с ХСН [1], в которых предложено рассчитывать режим физической реабилитации эмпирически, на основании теста с 6-минутной ходьбой (ТШХ), или исходя из объема кислорода, поглощаемого на пике физической нагрузки ( $VO_{2peak}$ ). Тем не менее, результаты ТШХ в значительной мере зависят от мотивации больного и врача, контролирующего выполнение теста, наличия у пациента сопутствующей патологии и многих других факторов, следовательно, программа физической реабилитации, рассчитанная на основании результатов теста с шестиминутной ходьбой (ТШХ), может быть не вполне точной [1, 6].

Показатель же  $VO_{2peak}$  также в высокой степени определяется мотивацией больного [1, 6]. Некоторые аспекты в определении режима тренировок больным ХСН остаются открытыми: отсутствуют единые принципы управления процессами адаптации организма к физической нагрузке, не до конца разработана теория планирования эффективных, безопасных, персонализированных нагрузок [1, 6].

В 2012г мы предложили проводить подбор режима тренирующей ходьбы на основании определения лактатного порога [7, 9]. Преимущество такого подхода состоит в повышении точности определения биологических резервов адаптации организма к физической нагрузке. Использование этого метода в сравнении с предшествующими обуславливает возможность персонализированного подхода в составлении программ физической реабилитации у любых пациентов с сердечно-сосудистой патологией [5, 7, 9]. В настоящем исследовании в ходе пилотного проекта “ФОРМА” продемонстрирована безопасность и эффективность данного подхода к ФР у больных III ФК ХСН. Использование предложенного метода позволяет рассчитать программу физической реабилитации таким образом, чтобы избежать развития утомления и, следовательно, назначать более длительные физические тренировки. Помимо этого, метод дает возможность плавно повышать нагрузку на основании повторного определения возрастающего лактатного порога. Из этого вытекают два важнейших следствия. Первое — большее снижение активности ЭРФ в основной группе, и как результат — снижение нейрогуморальной активации [5]. Второе: большая длительность тренировок может способствовать возрастанию числа митохондрий и увеличению переносимости физических нагрузок по сравнению с рутинными способами расчета режима ФР больных ХСН, когда время тренировки и нагрузка пациента строго фиксированы. Последнее положение подтверждается тем, что только в группе больных, у которых нагрузка подбиралась на основании дина-

мично меняющегося в ходе наблюдения лактатного порога, более значительно возросла ТФН, а у пациентов, тренирующихся более 1,5 ч/сут., повысилась эффективность физической реабилитации в отношении инверсии ремоделирования миокарда.

**Ограничения исследования:** относительно малое количество больных в группе длительных тренировок. Исследование выполнено в одном центре.

### Заключение

1) *In vitro* потенциал к мышечной дифференцировке, регенерации и росту сателлитных клеток клеток-предшественников скелетной мускулатуры, полученных от больных СНФВ, не отличается от потенциала сателлитных клеток здоровых доноров;

2) Аэробные тренировки у больных ХСН III ФК рассчитанные на основании определения лактатного порога, по безопасности не уступают результатам тренировочной ходьбы, который рассчитывался по уровню  $VO_{2peak}$ ;

3) Аэробные тренировки у больных ХСН III ФК рассчитанные на основании определения лактатного порога, по сравнению с обычным режимом тренировочной ходьбы, достоверно снижают активность эргорефлекса, повышают ТФН, уменьшают выраженность ХСН;

4) Тренировочная ходьба продолжительностью более 1,5 ч/сут., режим которой был определен по уровню лактатного порога, у пациентов с ХСН III ФК способствует развитию физиологического обратного ремоделирования миокарда в большей степени, чем аэробные тренировки, которые рассчитывались традиционным методом.

**Финансирование.** Работа частично выполнена при поддержке гранта РНФ №16-15-1017.

**Конфликт интересов:** все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

### Литература/References

- Arutyunov GP, Kolesnikova EA, Begrambekova YuL, et al. Recommendations for the appointment of physical training for patients with chronic heart failure. Russian Heart Failure Journal. 2017;18(1):41-66. (In Russ) Арутюнов Г.П., Колесникова Е.А., Беграмбекова Ю.Л. и др. Рекомендации по назначению физических тренировок пациентам с хронической сердечной недостаточностью. Журнал Сердечная Недостаточность. 2017;18(1):41-66. doi:10.18087/rhfj.2017.1.2339.
- 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur Heart J. 2016 Jul 14;37(27):2129-200. doi:10.1093/eurheartj/ehw128.
- Smolina AD, Kostareva AA, Bruton JO, et al. Primary Murine Myotubes as a Model for Investigating Muscular Dystrophy. Biomed Res. Int. 2015;1-12. doi:10.1007/978-1-4939-3584-0\_19.
- Keire P, Shearer A, Shefer G, et al. Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells. Methods Mol Biol. 2013;946:431-68. doi:10.1155/2015/582614.
- National recommendations of HFSS, RCS on the diagnosis and treatment of chronic heart failure (fourth revision). Russian Heart Failure Journal. 2016;14:7(81). (In Russ) Национальные рекомендации ОССН, РКО и РНМОТ по диагностике и лечению ХСН (четвертый пересмотр). Журнал Сердечная Недостаточность. 2016;14:7(81). doi:10.18087/rhfj.2016.2.2193.
- Massimo F, Viviane C, Ugo C. Exercise training in heart failure: from theory to practice. A consensus document of the Heart Failure Association and the European Association European Journal of Heart Failure. 2011;13:347-57. doi:10.1093/eurjhf/hfr017.
- Lelyavina TA, Sitnikova MYu, Shlyakhto EV. Effectiveness of individualized selection of physical rehabilitation regimen in patients with chronic heart failure with III NYHA class. Journal Medical alphabet. 2014;14:32-5. (In Russ.) Леявина Т.А., Ситникова М.Ю., Шлякто Е.В. Эффективность индивидуализированного подбора режима физической реабилитации у больных хронической сердечной недостаточностью III функционального класса. Медицинский алфавит. 2014;14:32-5.
- Piepoli M, Ponikowski P, Clark AL, et al. A neural link to explain the “muscle hypothesis” of exercise intolerance in chronic heart failure. Am Heart J. 1999;137:1050-6.
- Lelyavina T, Sitnikova M, Beresina A, et al. New Approaches to Marking Stages of Incremental Physical Work by Example of Cardiopulmonary Exercise Testing. Journal of US-China Medical Science. 2014;11:1(93):9-13.
- Lelyavina T, Sitnikova M, Galenko V, et al. Aerobic training in heart failure patients with optimal heart failure therapy — a prospective randomized study. World Journal of Pharmaceutical Research. 2017;6(2):59-67.