

Анализ транскриптома скелетной мускулатуры выявил влияние физических тренировок на молекулярные механизмы регуляции роста и метаболизма мышечной ткани у пациентов с хронической сердечной недостаточностью

Иванова О.А.^{1,2}, Игнатова Е.В.¹, Лелявина Т.А.¹, Галенко В.Л.¹, Комарова М.Ю.¹, Борцова М.А.¹, Ситникова М.Ю.¹, Костарева А.А.^{1,3}, Сергушичев А.А.², Дмитриева Р.И.¹

Цель. Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) сопровождается истощением скелетной мускулатуры и непереносимостью физических нагрузок. Целью настоящего проекта было исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе терапевтического эффекта персонализированных физических тренировок у пациентов с ХСН.

Материал и методы. Секвенирование РНК, полученной из биоптатов мышц скелетной мускулатуры до и после двенадцатинедельного курса тренировок, было использовано для выявления изменений экспрессии генов и сигнальных путей, индуцированных программой физической реабилитации пациентов с ХСН.

Результаты. Мы показали, что персонализированные физические тренировки у пациентов с ХСН стимулируют активацию молекулярных путей, контролирующих дифференцировку и функционирование скелетной мускулатуры: коммитирование клеток-предшественников мышечной ткани; механизмы, регулирующие высвобождение кальция и чувствительность сократительного аппарата миофибрилл, электрическую возбудимость мышечной мембраны, генерацию протонного градиента синаптических везикул, поддержание электрохимических градиентов ионов Na^+/K^+ . Также анализ дифференциально экспрессирующихся генов выявил повышение экспрессии транскрипционных факторов MyoD и MEF2, ответственных за дифференцировку стволовых клеток мышц, и саркомерных генов MYOM1, MYOM2, MYH7. Наряду с этим наблюдалась активация экспрессии гена секретируемого сигнального белка Cyr61, кандидата на роль прогностического биомаркера для пациентов с ХСН.

Заключение. Наши данные показывают, что благоприятный эффект персонализированных аэробных физических тренировок у больных с ХСН зависит, по крайней мере, частично, от улучшения физиологических и биохимических показателей скелетной мускулатуры.

Ключевые слова: сердечная недостаточность, физические тренировки, истощение скелетной мускулатуры, РНК-секвенирование, сигнальные пути, экспрессия генов.

Отношения и деятельность. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 16-15-10178.

¹ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

²Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия; ³Department of Women's and Children's Health, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

Иванова О.А. — м.н.с., группа клеточной биологии, Институт Молекулярной Биологии и Генетики, ORCID: 0000-0002-6163-2162, Игнатова Е.В. — м.н.с., лаборатория молекулярной кардиологии, Институт Молекулярной Биологии и Генетики, ORCID: 0000-0002-1423-6562, Лелявина Т.А. — в.н.с., НИО сердечной недостаточности, ORCID: 0000-0001-6796-4064, Галенко В.Л. — м.н.с., НИО сердечной недостаточности, ORCID: 0000-0002-0503-167X, Комарова М.Ю. — м.н.с., группа клеточной биологии, Институт Молекулярной Биологии и Генетики, ORCID: 0000-0002-7520-090X, Борцова М.А. — зав. кардиологическим отделением № 8, ORCID: 0000-0002-9694-7850, Ситникова М.Ю. — профессор кафедры внутренних болезней, зав. НИО сердечной недостаточности, ORCID: 0000-0002-0139-5177, Костарева А.А. — директор, Институт Молекулярной Биологии и Генетики, ORCID: 0000-0002-9349-6257, Сергушичев А.А. — доцент факультета информационных технологий и программирования, ORCID: 0000-0003-1159-7220, Дмитриева Р.И.* — в.н.с., руководитель группы клеточной биологии, Институт Молекулярной Биологии и Генетики, ORCID: 0000-0002-3073-7914.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
renata.i.dmitrieva@gmail.com

АП — анаэробный порог, MAPK — митоген-активированные протеинкиназы, СК — стволовые клетки, СН — сердечная недостаточность, ХСН — хроническая сердечная недостаточность, VO_2 — поглощение кислорода.

Рукопись получена 30.09.2020

Рецензия получена 15.10.2020

Принята к публикации 15.10.2020



Для цитирования: Иванова О.А., Игнатова Е.В., Лелявина Т.А., Галенко В.Л., Комарова М.Ю., Борцова М.А., Ситникова М.Ю., Костарева А.А., Сергушичев А.А., Дмитриева Р.И. Анализ транскриптома скелетной мускулатуры выявил влияние физических тренировок на молекулярные механизмы регуляции роста и метаболизма мышечной ткани у пациентов с хронической сердечной недостаточностью. *Российский кардиологический журнал*. 2020;25(10):4132. doi:10.15829/1560-4071-2020-4132

Transcriptome analysis of skeletal muscles revealed the effect of exercise on the molecular mechanisms regulating muscle growth and metabolism in patients with heart failure

Ivanova O.A.^{1,2}, Ignatieva E.V.¹, Lelyavina T.A.¹, Galenko V.L.¹, Komarova M.Yu.¹, Bortsova M.A.¹, Sitnikova M.Yu.¹, Kostareva A.A.^{1,3}, Sergushichev A.A.², Dmitrieva R.I.¹

Aim. Heart failure (HF) is accompanied by skeletal muscle atrophy and exercise intolerance. The aim was to study the molecular mechanisms underlying the therapeutic effect of personalized exercise in patients with HF.

Material and methods. RNA sequencing obtained from skeletal muscle biopsies before and after a 12-week exercise course was used to identify changes in gene expression and signaling pathways induced by the physical rehabilitation program for patients with HF.

Results. We have shown that personalized exercise program in patients with HF stimulates the activation of molecular pathways regulating the differentiation and functioning of skeletal muscles: commitment of muscle progenitor cells; mechanisms regulating the calcium release and sensitivity of myofibrillar contraction, electrical excitability of the muscle membrane, synaptic vesicle proton gradient creation, maintenance of electrochemical gradients of Na^+/K^+ . Also, the analysis of differentially expressed genes revealed an increase in the expression

of transcription factors MyoD and MEF2, which are responsible for the differentiation of muscle stem cells, and sarcomeric genes *MYOM1*, *MYOM2*, *MYH7*. Along with this, we observed activation of the *CYR61* expression — a potential prognostic biomarker for HF patients.

Conclusion. Our data show that the beneficial effect of personalized aerobic exercise in patients with HF depends, at least in part, on an improvement in the physiological and biochemical parameters of skeletal muscle.

Key words: heart failure, exercise, skeletal muscle atrophy, RNA sequencing, signaling pathways, gene expression.

Relationships and Activities. This work was supported by the Russian Science Foundation (grant № 16-15-10178).

¹Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia; ²ITMO University, St. Petersburg, Russia; ³Department of Women's and Children's Health, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

Ivanova O. A. ORCID: 0000-0002-6163-2162, Ignatieva E. V. ORCID: 0000-0002-1423-6562, Lelyavina T. A. ORCID: 0000-0001-6796-4064, Galenko V. L. ORCID: 0000-0002-0503-167X, Komarova M. Yu. ORCID: 0000-0002-7520-090X, Bortsova M. A. ORCID: 0000-0002-9694-7850, Sitnikova M. Yu. ORCID: 0000-0002-0139-5177, Kostareva A. A. ORCID: 0000-0002-9349-6257, Sergushichev A. A. ORCID: 0000-0003-1159-7220, Dmitrieva R. I.* ORCID: 0000-0002-3073-7914.

*Corresponding author: renata.i.dmitrieva@gmail.com

Received: 30.09.2020 **Revision Received:** 15.10.2020 **Accepted:** 15.10.2020

For citation: Ivanova O. A., Ignatieva E. V., Lelyavina T. A., Galenko V. L., Komarova M. Yu., Bortsova M. A., Sitnikova M. Yu., Kostareva A. A., Sergushichev A. A., Dmitrieva R. I. Transcriptome analysis of skeletal muscles revealed the effect of exercise on the molecular mechanisms regulating muscle growth and metabolism in patients with heart failure. *Russian Journal of Cardiology*. 2020;25(10):4132. (In Russ.) doi:10.15829/1560-4071-2020-4132

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является одним из наиболее жизнеугрожающих состояний у сердечно-сосудистых пациентов в мире. При ХСН функциональные и метаболические изменения выявляются не только в сердечной мышце, но и в ткани скелетной мускулатуры: гипоксия, системное воспаление, окислительный стресс, нарушение клеточных механизмов окисления жирных кислот и митохондриальная дисфункция являются факторами, способствующими ХСН-индуцированному повреждению мышечной ткани. Патологические изменения скелетной мускулатуры включают развитие мышечной атрофии, развитие инсулинорезистентности, нарушение регуляции липидного обмена и патологическое замещение мышечной ткани на фиброзную и жировую. Все эти факторы приводят к развитию саркопении, снижению качества жизни и ухудшению прогноза у пациентов с ХСН [1]. Разработка эффективных профилактических и терапевтических стратегий борьбы с саркопенией у пациентов с ХСН остается нерешенной проблемой. В настоящее время программы аэробных физических тренировок признаны эффективной и безопасной терапевтической тактикой профилактики развития саркопении у пациентов с ХСН и внесены в практические рекомендации по диагностике и лечению сердечной недостаточности (СН) [2].

Обычно спортивные тренировки стимулируют увеличение массы скелетной мускулатуры за счет активации сателлитных клеток и реализации их потенциала миогенной дифференцировки. Недавно мы показали, что в мышечной ткани пациентов с ХСН хронически активирована программа регенерации мышечной ткани, которая не завершается формированием “взрослой”, функциональной мышечной ткани; такое состояние является патологическим и было описано ранее для разных типов мышечных дистрофий [3]. Однако в стандартизированных условиях *in vitro* резидентные стволовые клетки (СК) скелетной мускулатуры пациентов с ХСН активно диф-

ференцировались в миотрубки, демонстрируя сохранность регенеративного потенциала мышечной ткани при ХСН [3]. Таким образом, мы пришли к заключению, что активация резидентной СК у пациентов с ХСН возможна, и правильно подобранная программа физической реабилитации может способствовать активации регенераторного потенциала СК скелетной мускулатуры, восстановлению мышечной ткани и росту, препятствовать развитию саркопении и увеличивать толерантность к физическим нагрузкам.

Очевидно, что важной задачей при назначении терапевтической тренировочной программы является определение оптимальной/персонализированной интенсивности физических нагрузок для каждого пациента. В качестве параметров толерантности к физической нагрузке рассматривают анаэробный, или лактатный, порог (АП) и пиковое поглощение кислорода (VO_2); эти же параметры известны как показатели тяжести и прогноза ХСН [4]. АП определяется как интенсивность упражнений до достижения точки перегиба, при которой концентрация лактата в крови начинает нарастать быстрее, чем мышцы могут его утилизировать; таким образом, АП дает представление о том, как мышцы используют доступный кислород, являясь более информативным показателем общей работоспособности по сравнению с пиковым VO_2 [5]. Ранее было показано, что назначение индивидуальной программы аэробных упражнений, основанной на определении АП, приводит к лучшему терапевтическому результату (пик VO_2 , фракция выброса левого желудочка, толерантность к физической нагрузке), чем назначение аэробных тренировок на основе оценки пика VO_2 [6-8]. Также, наряду с клиническим ответом, гистологический анализ выявил уменьшение толщины как мышечных волокон, так и эндомизия после курса физических упражнений, что указывает на стабилизацию системы механотрансдукции скелетной мускулатуры пациентов в ответ на 12-нед. курс персонализированной программы физической реабилитации пациен-

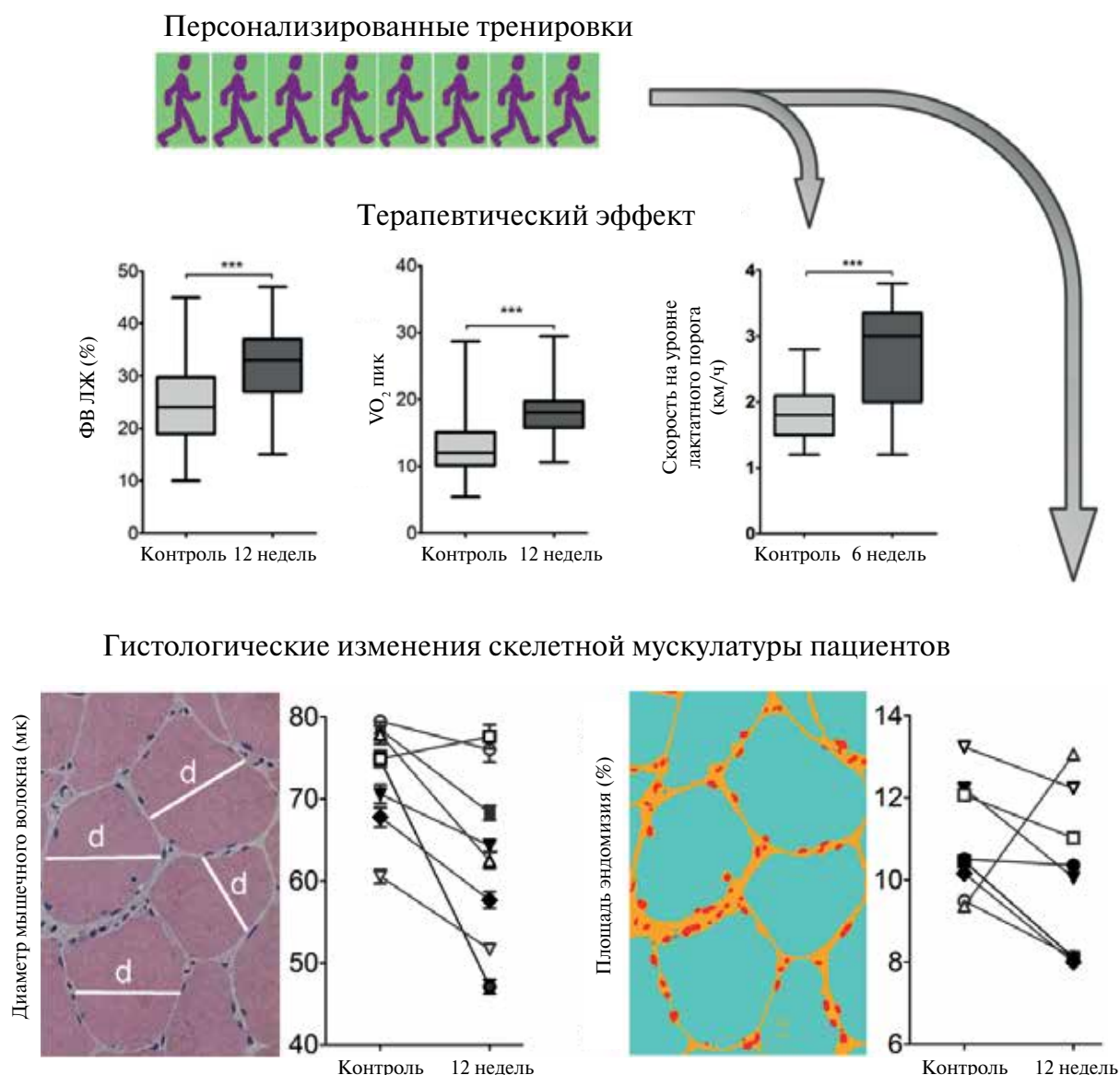


Рис. 1. Обобщенные результаты комплексного ответа пациентов на персонализированную программу физической реабилитации. Адаптировано из [9].

Примечание: индивидуальная программа тренировок определялась как рабочая нагрузка на уровне АП или близком к нему (LT1). Биопсии мышц у 8 пациентов были взяты до и после 12 нед. тренировки: гистологический анализ использовался для оценки морфологии мышц. Верхняя панель: большинство пациентов продемонстрировали положительный клинический ответ в ходе выполнения программы физической реабилитации: пик VO_2 , фракция выброса левого желудочка, скорость ходьбы на уровне АП. Нижняя панель: изменения диаметра мышечного волокна и толщины эндомизия в ответ на программу физической реабилитации.

Сокращение: ФВ ЛЖ — фракция выброса левого желудочка, АП — анаэробный порог.

тов [9]. Результаты предшествующих исследований обобщены на рисунке 1.

Целью этого исследования было оценить влияние персонализированных физических тренировок на молекулярные механизмы регуляции роста и метаболизма мышечной ткани у пациентов с ХСН.

Материал и методы

Исследование одобрено Комитетом по этике Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова (№ 54/14.03.2016) и проводи-

лось в соответствии с действующими стандартами надлежащей клинической практики и принципами Хельсинкской декларации. Все пациенты, участвующие в программе, до включения в исследование подписали одобренное Советом по институциональному обзору заявление об информированном согласии.

Протокол лечебной физкультуры. Индивидуальная программа физической реабилитации больных ХСН включала 1 ч ходьбы с интенсивностью нагрузки 90% на уровне АП (оценивалась как скорость, км/ч) не менее 4-5 раз в нед.; больные должны были вести

Таблица 1

Исходные характеристики пациентов, которыми были предоставлены образцы биопсии

Доноры	HF1	HF2	HF3	HF4	HF5	HF6
Возраст, лет	56	48	63	61	56	62
ИМТ, кг/м ²	27,07	26,46	24,1	32,87	26,77	23,32
ФВ ЛЖ, %	25	20	11	24	28	40
VO ₂ пик (мл/кг/мин)	16,2	13,6	17,3	11	13,1	22,5
Этиология заболевания (ДКМ/ИБС)	ДКМ	ДКМ	ИБС	ИБС	ИБС	ИБС

Примечание: все пациенты находились на стабильных индивидуально подобранных режимах медикаментозной терапии, включающих ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента или антагонисты рецепторов ангиотензина II, диуретики, бета-блокаторы; не имели сопутствующих заболеваний (хроническая обструктивная болезнь легких, ИБС, фибрилляция предсердий, анемия).

Сокращения: ДКМ — дилатационная кардиомиопатия, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМТ — индекс массы тела, ФВ ЛЖ — фракция выброса левого желудочка, VO₂ — поглощение кислорода.

дневник самоконтроля (оценивался ежемесячно); коррекция тренировочной нагрузки проводилась на втором амбулаторном визите; все больные наблюдались кардиологом в амбулаторном отделении. Образцы биопсий 3 пациентов до и после 12-нед. курса индивидуальных тренировок были использованы для анализа транскриптома с помощью РНК-секвенирования; всего исследовалось 6 образцов. Клинические и гистологические результаты пациентов СН до и после физической реабилитации описаны на рисунке 1 и в предыдущем исследовании [9].

Выделение и секвенирование РНК. РНК выделяли из мышечных биопсий с использованием ExtractRNA (#BC032, Evrogen); качество устанавливали с помощью Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies), используя BA RNA nano kit; концентрации РНК были определены на Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Библиотеки для секвенирования 3'-концевых последовательностей мРНК были подготовлены с использованием набора Quantseq 3'mRNA-Seq Library Prep Kit for Illumina (FWD) (Lexogen). Секвенирование РНК проводили на Illumina MiSeq в режиме одноконцового чтения. Длина прочтений составляла 150 п.н., среднее число ридов — 0,93 млн на образец. Результаты секвенирования 6 образцов, описанных в этой статье, выложены в открытую базу данных GEO под номером GSE134698.

Обработка данных РНК-секвенирования. Необработанные данные были получены в формате FASTQ непосредственно из MiSeq. Качество оценивалось с помощью программы FastQC (v0.11.5) (доступно онлайн по адресу: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Фильтрация ридов и удаление адаптерных последовательностей выполнены с помощью программы fastp (v0.20.0). Прочтения были выровнены на геном человека GRCh38.p12, используя маппер STAR v2.5 и аннотацию GENCODE v28. Выверенные риды подсчитывались с помощью программы featureCounts. Топ 12 тыс. наиболее экспрессируемых генов были выбраны после квантильной

и логарифмической нормализации для анализа дифференциальной экспрессии. Дифференцированно экспрессируемые гены определяли с помощью программного пакета DESeq2 для R. Данные были нормализованы в парах образцов для каждого пациента, разница в экспрессии была рассчитана между двумя состояниями: до и после физической нагрузки. Значения p-value скорректированы с помощью процедуры Бенджамини-Хохберга и отфильтрованы с применением критерия FDR = 0,1. Анализ обогащения набора генов (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) проводился для нахождения активированных и деактивированных молекулярных путей с использованием пакета fgsea [10], наборы генов были взяты из базы данных Gene Ontology Biological Processes; критерий значимости для путей FDR = 0,1.

Результаты

Реакция транскриптома скелетных мышц на физическую нагрузку у пациентов с ХСН. Анализ РНК-секвенирования является стандартным типом анализа, позволяющим получить механистическое понимание клеточной сигнализации в мышцах [11]. Для определения молекулярных механизмов, лежащих в основе терапевтического исхода, было проведено 3'мРНК-секвенирование на парах биоптатов скелетных мышц, полученных от трех пациентов с ХСН до и после 12 нед. физической нагрузки. Однако секвенирование образцов HF3 и HF6 имело недостаточную глубину покрытия, в то время как HF2 отличался низким количеством назначенных генов (табл. 1).

График принципиальных компонент продемонстрировал обусловленные тренировками изменения транскриптома скелетных мышц во всех трех парах биопсий, хотя разница между пациентами также была значительной (рис. 2А).

Для сравнения образцов до и после тренировок был составлен список дифференциально экспрессируемых генов, важных для развития и функционирования скелетных мышц (табл. 2). Мы применили

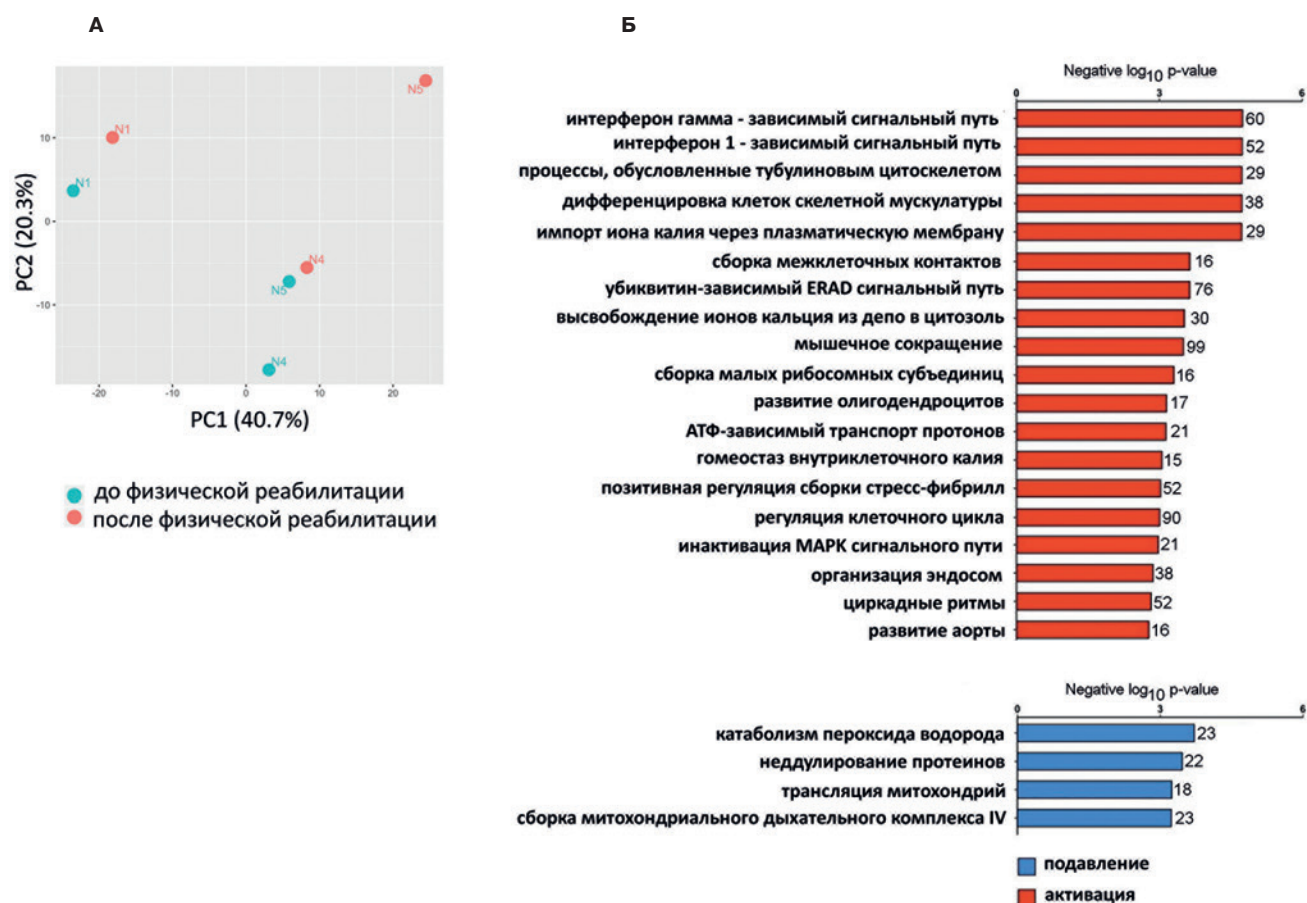


Рис. 2. Изменения сигнальных путей в скелетных мышцах пациентов с ХСН после 12 нед. физической нагрузки. **А.** График PCA (PCA — principal component analysis, принципиальные компоненты 1 и 2) для образцов пациентов показывает изменения в транскриптоме. Синим цветом обозначены образцы, взятые до прохождения курса реабилитации, красным — после. **Б.** Биологические процессы, которые были значительно ($FDR = 0,1$) активированы (красный) или подавлены (синий) в тренированных мышцах относительно нетренированных ($abs(NES) > 1,7$) после 12-нед. программы реабилитации пациентов с СН ($n=3$). Представлены значения p -value $< 0,001$; числа показывают количество генов, участвующих в активации/подавлении данного пути. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

анализ обогащения набора генов (GSEA) и идентифицировали 26 биологических процессов и путей, которые были значимо активированы или подавлены после курса тренировок (рис. 2Б). Полный список подмножеств генов, участвующих в активации/деактивации каждого молекулярного пути, приведен в таблице 2. Почти все гены и пути, идентифицированные как значительно апрегулированные, могут быть отнесены к следующим трем группам. Во-первых, это гены, участвующие в росте и регенерации мышц (*MEF2*, *MyoD*, *HSP90*, *IER5*). В список генов, принадлежащих к пути “дифференцировка клеток скелетной мускулатуры”, вошли транскрипционный фактор *MYOD* и миоцит-специфический энхансерный фактор *MEF2*, который взаимодействует с членами семейства *MyoD* в процессе стимуляции регенерации мускулатуры. Кроме того, повышена экспрессия гена *NACA*, участвующего в регуляции постнатального роста и регенерации скелетных мышц.

Во-вторых, мы выявили повышенную регуляцию саркомерных генов и генов, вовлеченных в сигналь-

ный путь регуляции кальция. Те и другие участвуют в сокращении и расслаблении мышц (*MYH7*, *ACTA1*, *TNNT1*, *TNNI3*, *TNNI1*, *MYL9*, *MYOM2*, *MYOM1*, *RYR1*).

Третья группа значимо апрегулированных генов включала гены, играющие критическую роль в поддержании структурной целостности мышечных волокон, включая компоненты актин-интегринового цитоскелета и актин-модулирующие гены (*ACTB*, *ACTG1*, *GSC*, *LIMS2*). Эта группа также содержит подмножество генов, ассоциированных с Z-дисксом (*FLNC*, *PLEC*, *KLHL40*, *SYNPO2L*, *HSPB7*). Сигнальные гены, вовлеченные в механодетекцию и механотрансдукцию, также были апрегулированы (*CYR61*).

Кроме того, мы обнаружили повышенную экспрессию генов, относящихся к сигнальному пути, регулирующему гидролиз АТФ, связанный с протонным транспортом (табл. 1), а именно, генов, опосредующих ацидификацию внутриклеточных органелл эукариот, необходимых для генерации протонного градиента в синаптических пузырьках (*ATP6V1B2*,

ATP6V1F, ATP6V0A1, ATP6AP1, ATP6V0D1), и генов, ответственных за поддержание электрохимических градиентов ионов Na^+/K^+ через плазматическую мембрану (*ATP1A1, ATP1A2*). Мы также наблюдали повышенную экспрессию генов, участвующих в инсулин-зависимом транспорте глюкозы (*GLUT4*) и функционировании митохондрий (*SLC25A4, NDUF3, LYRM7, ND6*).

Обсуждение

Основной вывод настоящего исследования заключается в том, что вызванное тренировкой улучшение здоровья, включая повышение толерантности к физической нагрузке у пациентов с СН, было связано с активацией сигнальных путей, ответственных за потенциал регенерации скелетных мышц: результаты анализа секвенирования транскриптомов до и после курса упражнений определенно указывают на вызванную тренировкой стимуляцию мышечной регенерации и функции у пациентов с СН (рис. 2Б).

Это наблюдение важно и ново: большинство опубликованных работ содержат доказательства, подтверждающие мнение о том, что СК скелетных мышц больных с СН плохо поддерживают рост мышц из-за ряда патологических факторов, включая ингибирование активации и пролиферации сателлитных клеток белком Ang II через его рецептор I типа [12], более низкую плотность капиллярной сети в мышцах [13], устойчивую активацию основных путей деградации белков — протеосомного и лизосомально-аутофагического [14]. В наших последних работах, однако, мы продемонстрировали, что в стандартизированных условиях *in vitro* СК скелетных мышц и костного мозга, полученные от пациентов с СН, не теряют регенеративного потенциала, что свидетельствует о том, что стабилизация микроокружения *in vivo* может привести к физиологически значимой активации СК [3, 15]. В настоящей работе мы показываем, что этот потенциал может быть стимулирован у пациентов с СН с помощью персонализированного курса тренировок, что приводит к предотвращению мышечного истощения и повышению толерантности к физической нагрузке.

В норме адаптация, обусловленная тренировкой, у здоровых людей отражается изменениями в сократительных белках и их функциях, митохондриальной функции, метаболической регуляции, внутриклеточной сигнализации и транскрипционных изменениях (обзор в работе [16]). У пациентов с СН снижена максимальная производительная способность, поэтому относительная нагрузка у пациентов с СН выше, чем у здоровых доноров, и этот вопрос следует учитывать при сравнении данных, полученных от здоровых доноров и пациентов с СН. Кроме того, непереносимость физической нагрузки у пациентов с СН может быть результатом снижения окислительного

метаболизма и усиления глюконеогенеза в тренированных мышцах и/или из-за низкого уровня доставки кислорода и физической инертности пациентов с СН, или того и другого, и эти ограничения также следует учитывать. Поэтому, чтобы установить правильную персонализированную интенсивность упражнений, мы определили LT1 для каждого пациента и назначили 60-минутную скорость ходьбы на уровне LT1 или близком к нему. Наблюдаемые изменения транскриптома у пациентов с СН (рис. 2) хорошо согласуются с данными, полученными другими для здоровых доноров: индуцированный физической нагрузкой специфический транскриптомный ответ на сократительную активность был описан для здоровых доноров [17], в работе Dickinson JM, et al. (2018) авторы обнаружили специфичный для аэробных упражнений кластер генов, связанный с убиквитинированием [18]. Однако следует иметь в виду, что данные от здоровых доноров были получены для короткого курса физических упражнений, в то время как наши пациенты проходили длительную программу тренировок, что указывает на необходимость дальнейших исследований.

Важно отметить, что в нашей работе мы также обнаружили повышенную регуляцию генов, участвующих в модуляции внутриклеточных сигнальных путей TGF β и WNT, которые важны для регуляции васкуляризации тканей [19]. Кроме того, известно, что дифференциально экспрессируемый ген *CYR61*, относящийся к группе белков, связывающих инсулиноподобный фактор роста (IGF) (табл. 2), участвует в регуляции ангиогенного фактора VEGF через механизмы цитоскелетной механотрансдукции [20], а увеличение его экспрессии в скелетных мышцах как на уровне мРНК, так и на уровне белка было обнаружено у здоровых людей после физической нагрузки. Кроме того, было показано, что сывороточный уровень *CYR61* коррелирует со смертностью в течение 6 мес. у пациентов с острой СН, и авторы предложили сывороточный *CYR61* в качестве перспективного прогностического биомаркера для пациентов с СН [21]. Эти данные вместе с нашими наблюдениями указывают на необходимость проведения дополнительных исследований для уточнения роли *CYR61* в патогенезе СН, тканеспецифических функций *CYR61*, его диагностической и прогностической значимости при СН.

Ключевым наблюдением в нашем исследовании является вызванная тренировкой стимуляция пути, способствующего инактивации митоген-активированных протеинкиназ (МАРК) (рис. 2Б). МАРК играют критическую роль в ремоделировании мышечной ткани в ответ на повышенную нагрузку или патологические нарушения; при прогрессирующей СН активируется каждая из трёх ветвей сигнального пути МАРК, независимо от природы заболевания [22]. Инактивация МАРК регулируется специа-

Таблица 2

Дифференциально экспрессируемые гены со значениями p-values <0,05 и fold change >1,5

Название генов	Ensembl ID	P value adjusted	log2 FC	Описание
CYR61	ENSG00000142871	3,15E-05	1,745	cellular communication network factor 1
RYR1	ENSG00000196218	1,97E-02	0,960	ryanodine receptor 1
PLEC	ENSG00000178209	1,60E-02	1,064	plectin
APH1A	ENSG00000117362	5,67E-02	1,008	Aph-1 homolog A, gamma-secretase subunit
HSP90AB1	ENSG00000096384	5,67E-02	0,905	Heat shock protein 90 alpha family class B member 1
SYNPO2L	ENSG00000166317	5,67E-02	0,867	Synaptopodin 2 like
SLC25A4	ENSG00000151729	5,67E-02	-0,939	Solute carrier family 25 member 4
FLNC	ENSG00000128591	8,42E-02	0,873	Filamin C
SLC2A4	ENSG00000181856	8,42E-02	0,809	Solute carrier family 2 member 4
CRLF1	ENSG00000006016	8,42E-02	1,053	Cytokine receptor like factor 1
MPST	ENSG00000128309	8,80E-02	1,147	Mercaptopyruvate sulfurtransferase
IER5	ENSG00000162783	8,80E-02	1,038	Immediate early response 5
MT2A	ENSG00000125148	8,80E-02	1,169	Metallothionein 2A
RERE	ENSG00000142599	8,80E-02	0,955	Arginine-glutamic acid dipeptide repeats
HSPB7	ENSG00000173641	8,80E-02	0,812	Heat shock protein family B (small) member 7
CAVIN4	ENSG00000170681	8,80E-02	-0,909	Caveolae associated protein 4
NACA	ENSG00000196531	8,80E-02	0,857	Nascent polypeptide associated complex subunit alpha
KLHL40	ENSG00000157119	9,96E-02	1,034	Kelch like family member 40
GSN	ENSG00000148180	9,96E-02	0,769	Gelsolin
PSMD3	ENSG00000108344	9,96E-02	0,924	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 3
NDUFS3	ENSG00000213619	9,96E-02	0,778	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S3
RN7SL2	ENSG00000274012	5,27E-02	1,592	RNA component of signal recognition particle 7SL2
BCYRN1	ENSG00000236824	6,56E-02	1,109	Brain cytoplasmic RNA 1
LYRM7	ENSG00000186687	9,98E-02	-1,173	LYR motif containing 7
TAPBP	ENSG00000231925	9,98E-02	1,065	TAP binding protein
SELENOW	ENSG00000178980	9,72E-02	-0,756	Selenoprotein W
ND6	ENSG00000198695	5,56E-02	1,340	Mitochondrially encoded NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit 6
TUBA1C	ENSG00000167553	8,31E-02	1,124	Tubulin alpha 1c

Примечания: p-value adjusted = 0,1; значения p-value adjusted получены после применения процедуры Бенджамини-Хохберга над p-values для поправки на множественные сравнения; параметр log2 FC (log2 fold change) представляет собой то, во сколько раз по степени двойки изменилась экспрессия данного гена в образцах после физических упражнений.

лизированными двуспецифичными фосфатазами (DUSP), а DUSP-зависимая регуляция MAPK динамически изменяет тканевые реакции на физиологические и патологические стимулы [22]; роль MAPK в регенерации скелетных мышц, а также кардиопротекторные эффекты ингибиторов p38 MAPK, были показаны на различных крысиных и клеточных моделях [23, 24]. Cosgrove BD, et al. (2014) и Bernet JD, et al. (2014) показали, что повышение активности p38 MAPK-пути приводит к нарушению способности к самообновлению старых мышечных СК, но фармакологическое ингибирование или нокдаун p38- α/β способствует их омоложению [25, 26]. Принимая во внимание эти результаты, наряду с полученными нами ранее данными, которые подтверждают способность СК пациентов с СН дифференцироваться в поддерживающей среде *in vitro* [3, 15], мы полагаем, что инактивация MAPK-пути, индуцированная тренировками (рис. 2Б), может способствовать пре-

ждению истощения скелетной мускулатуры у пациентов с ХСН за счет восстановления регенеративного потенциала мышечных СК.

Известным отличительным признаком реакции на тренировку выносливости является митохондриальный биогенез в сочетании с улучшением функциональных параметров митохондрий. Однако в нашем исследовании мы наблюдали снижение активности путей, регулирующих сборку комплекса IV дыхательной цепи митохондрий и трансляцию митохондрий (рис. 2Б). Эти неожиданные наблюдения могут отражать либо дальнейшую посттранскрипционную регуляцию митохондриальных ферментов [27], либо тот факт, что комплексное системное нарушение энергетического метаболизма как миокарда, так и скелетных мышц является значимым аспектом патофизиологии ХСН [1]. Поэтому динамика функциональных параметров митохондрий при физической реабилитации больных СН должна быть рассмотрена в иссле-

довании, специально разработанном для решения этой сложной проблемы.

Заключение

Мы продемонстрировали возможность стимуляции с помощью тренировки молекулярных путей и генов, ответственных за дифференцировку и развитие скелетных мышц у пациентов с СН. Этот молекулярный ответ включает в себя активацию СК скелетных мышц, развитие миофибрилл, организацию и функционирование мышечной ткани. Наши дан-

ные обеспечивают важную основу для дальнейших исследований, направленных на улучшение понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе терапевтических эффектов персонализированных физических тренировок у пациентов с СН, с целью разработки новых фармакологических подходов к профилактике и лечению истощения скелетных мышц при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Отношения и деятельность. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 16-15-10178.

Литература/References

1. Zizola C, Schulze PC. Metabolic and structural impairment of skeletal muscle in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 2013;18:623-30. doi:10.1007/s10741-012-9353-8.
2. Springer J, Springer J-I, Anker SD. Muscle wasting and sarcopenia in heart failure and beyond: update 2017. *ESC Hear. Fail.* 2017;4:492-8. doi:10.1002/ehf2.12237.
3. Dmitrieva RI, Lelyavina TA, Komarova MY, et al. Skeletal muscle resident progenitor cells coexpress mesenchymal and myogenic markers and are not affected by chronic heart failure-induced dysregulations. *Stem Cells Int.* 2019;1-11. doi:10.1155/2019/5690345.
4. Agostoni P, Dumitrescu D. How to perform and report a cardiopulmonary exercise test in patients with chronic heart failure. *Int. J. Cardiol.* 2019;288:107-13. doi:10.1016/j.ijcard.2019.04.053.
5. Wagner J, Agostoni P, Arena R, et al. The Role of Gas Exchange Variables in Cardiopulmonary Exercise Testing for Risk Stratification and Management of Heart Failure with Reduced Ejection Fraction. *Am Heart J.* 2018;202:116-26. doi:10.1016/j.ahj.2018.05.009.
6. Lelyavina T, Sitnikova M, Shlyakhto E. Diagnostic and prognostic value of lactate threshold and pH — threshold determination during cardiopulmonary testing in patients with chronic heart failure. *Br J Med. Med. Res.* 2015;5:289-96. doi:10.9734/BJMMR/2015/12920.
7. Lelyavina T, Sitnikova M, Galenko V, et al. Aerobic training in heart failure patients with optimal heart failure therapy — a prospective randomized study. *World J. Pharm. Res.* 2017;6:59-67.
8. Galenko VL, Lelyavina TA, Sitnikova MY. Response predictors for physical training HFrEF patients. *Kardiologija.* 2018;58:22-8. (In Russ.) Галенко В.Л., Лелявина Т.А., Ситникова М.Ю. Предикторы ответа на физические тренировки у больных СНнФВ. *Кардиология.* 2018;58(54):22-8. doi:10.18087/cardio.2434.
9. Lelyavina TA, Galenko VL, Ivanova AO, et al. Clinical Response to Personalized Exercise Therapy in Heart Failure Patients with Reduced Ejection Fraction Is Accompanied by Skeletal Muscle Histological Alterations. *International journal of molecular sciences.* 2019;20(21):551. doi:10.3390/ijms20215514.
10. Sergushichev AA. An algorithm for fast preranked gene set enrichment analysis using cumulative statistic calculation. *bioRxiv.* 2016;60012. doi:10.1101/060012.
11. Popov DV, Makhnovskii PA, Shagimardanova EI, et al. Contractile activity-specific transcriptome response to acute endurance exercise and training in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2019;316:E605-E614. doi:10.1152/ajpendo.00449.2018.
12. Yoshida T, Delafontaine P. An Intronic Enhancer Element Regulates Angiotensin II Type 2 Receptor Expression during Satellite Cell Differentiation, and Its Activity Is Suppressed in Congestive Heart Failure. *J Biol Chem.* 2016;291:25578-90. doi:10.1074/jbc.M116.752501.
13. Hendrickse P, Degens H. The role of the microcirculation in muscle function and plasticity. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2019;40:127-40. doi:10.1007/s10974-019-09520-2.
14. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 2013;280:4294-314. doi:10.1111/febs.12253.
15. Dmitrieva RI, Revittser AV, Klukina MA, et al. Functional properties of bone marrow derived multipotent mesenchymal stromal cells are altered in heart failure patients, and could be corrected by adjustment of expansion strategies. *Aging (Albany, NY).* 2015;7:14-25. doi:10.18632/aging.100716.
16. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab.* 2013;17:162-84. doi:10.1016/j.cmet.2012.12.012.
17. Binder RK, Wonisch M, Corra U, et al. Methodological approach to the first and second lactate threshold in incremental cardiopulmonary exercise testing. *Eur. J. Prev. Cardiol.* 2008;15:726-34. doi:10.1097/HJR.0b013e328304fed4.
18. Dickinson JM, D'Lugos AC, Naymik MA, et al. Transcriptome response of human skeletal muscle to divergent exercise stimuli. *J. Appl. Physiol.* 2018;124:1529-40. doi:10.1152/japplphysiol.00014.2018.
19. Muppala S, Xiao R, Krukovets I, et al. Thrombospondin-4 mediates TGF- β -induced angiogenesis. *Oncogene.* 2017;36:5189-98. doi:10.1038/ncr.2017140.
20. Lavine KJ, Sierra OL. Skeletal muscle inflammation and atrophy in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 2017;22:179-89. doi:10.1007/s10741-016-9593-0.
21. Zhao J, Zhang C, Liu J, et al. Cellular Physiology and Biochemistry Cellular Physiology and Biochemistry Prognostic Significance of Serum Cysteine-Rich Protein 61 in Patients with Acute Heart Failure. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48:1177-87. doi:10.1159/000491984.
22. Liu R, Molkenin JD. Regulation of cardiac hypertrophy and remodeling through the dual-specificity MAPK phosphatases (DUSPs). *J Mol Cell Cardiol.* 2016;101:44-9. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.08.018.
23. Li C, Wang T, Zhang C, et al. Quercetin attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Gene.* 2016;577:275-80. doi:10.1016/j.gene.2015.12.012.
24. Takeshima H, Kobayashi N, Koguchi W, et al. Cardioprotective effect of a combination of Rho-kinase inhibitor and P38 MAPK inhibitor on cardiovascular remodeling and oxidative stress in Dahl rats. *J. Atheroscler. Thromb.* 2012;19:326-36. doi:10.5551/jat.11114.
25. Cosgrove BD, Gilbert PM, Porpiglia E, et al. Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles. *Nat. Med.* 2014;20:255-64. doi:10.1038/nm.3464.
26. Bernet JD, Doles JD, Hall JK, et al. P38 MAPK signaling underlies a cell-autonomous loss of stem cell self-renewal in skeletal muscle of aged mice. *Nat. Med.* 2014;20:265-71. doi:10.1038/nm.3465.
27. Popov DV, Lysenko EA, Bokov RO, et al. Effect of aerobic training on baseline expression of signaling and respiratory proteins in human skeletal muscle. *Physiol. Rep.* 2018;6(17):e13868. doi:10.14814/phy2.13868.