

<https://doi.org/10.47529/2223-2524.2022.2.10>

УДК: 575, 616-008

Тип статьи: Оригинальное исследование / Original article



## Сравнение профилей экспрессии микроРНК атлетов, выступающих в видах спорта, ориентированных на выносливость, и добровольцев, не занимающихся спортом, с использованием панели сигнального пути гипоксии

И.В. Пронина<sup>1,2</sup>, П.В. Постников<sup>1\*</sup>, В.И. Павлов<sup>3</sup>, З.Г. Орджоникидзе<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Национальная антидопинговая лаборатория (Институт) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

<sup>3</sup>ГАУЗ «Московский научно-практический центр медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва, Россия

### РЕЗЮМЕ

В последние годы интерес к поиску новых потенциальных молекулярных биомаркеров для оценки эффективности тренировочного процесса в спорте высших достижений, различных патологий, вызванных перегрузками, и злоупотребления запрещенными препаратами достиг небывалого уровня. МикроРНК, регулирующие на посттранскрипционном уровне процессы метаболизма, дифференциации, пролиферации и апоптоза клеток, являются наиболее ценными кандидатами для использования в этом отношении. Они обнаружены во всех биологических жидкостях организма человека, стабильны при долгосрочном хранении и устойчивы к изменениям условий среды. Известно, что изменение профиля экспрессии микроРНК имеет тесную связь с физическим нагружением, а также с введением рекомбинантных гормонов, эритропоэзстимулирующих агентов и других запрещенных Всемирным антидопинговым агентством (ВАДА) препаратов и методов, улучшающих спортивные результаты.

**Цель исследования:** в данной работе проанализированы образцы плазмы крови спортсменов, задействованных в видах спорта, ориентированных на выносливость (спортивная ходьба), и добровольцев, не занимающихся спортом, с использованием панели сигнального пути гипоксии с целью выявления маркеров-кандидатов гипоксии.

**Материалы и методы:** оценка профилей экспрессии циркулирующих микроРНК плазмы крови проводилась методом обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР с детекцией в реальном времени. Полученные данные подверглись статистической обработке при помощи программы CFX Manager Software v3.1.

**Результаты:** определены три потенциальных микроРНК-маркера: hsa-miR-210-3p, hsa-miR-320a и hsa-miR-935 (повышены у спортсменов в 61,6, 51,8 и 41,0 раза соответственно) — физиологического ответа на тренировочную нагрузку, которые могут быть связаны с возникновением гипоксии при тренировках на выносливость.

**Заключение:** нами получены предварительные данные о различиях в профилях экспрессии циркулирующих микроРНК у здоровых добровольцев, не занимающихся спортом, и спортсменов во внесоревновательный период. В дальнейшем планируется расширить выборку исследованных образцов плазмы крови и провести сравнение профилей экспрессии циркулирующих микроРНК в соревновательный и внесоревновательный периоды у спортсменов, сравнить профили экспрессии циркулирующих микроРНК при аэробных и анаэробных нагрузках. Кроме того, представляет интерес анализ изменений экспрессии циркулирующих микроРНК при использовании миметиков гипоксии, употребляемых с целью улучшения спортивных результатов.

**Ключевые слова:** циркулирующие микроРНК, биомаркеры, физическая нагрузка, эффективность тренировочного процесса, выносливость, гипоксия, допинг-контроль

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Пронина И.В., Постников П.В., Павлов В.И., Орджоникидзе З.Г. Сравнение профилей экспрессии микроРНК атлетов, выступающих в видах спорта, ориентированных на выносливость, и добровольцев, не занимающихся спортом, с использованием панели сигнального пути гипоксии. *Спортивная медицина: наука и практика*. 2022;12(2):13–21. <https://doi.org/10.47529/22232524.2022.2.10>

Поступила в редакцию: 22.02.2022

Принята к публикации: 28.07.2022

Online first: 05.08.2022

Опубликована: 30.09.2022

\* Автор, ответственный за переписку

# Comparison of microRNA expression profiles of athletes involved in endurance sports and non-athletic volunteers using a hypoxia signaling pathway panel

Irina V. Pronina<sup>1,2</sup>, Pavel V. Postnikov<sup>1,\*</sup>, Vladimir I. Pavlov<sup>3</sup>, Zurab G. Ordzhonikidze<sup>3</sup>

<sup>1</sup>National Anti-Doping Laboratory (Institute) of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Moscow Centre for Research and Practice in Medical Rehabilitation, Restorative and Sports Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

## ABSTRACT

In recent years, interest in the search for new potential molecular biomarkers to assess the effectiveness of the training process in elite sports, various pathologies caused by overload, and abuse of prohibited substances has reached an unprecedented level. MicroRNAs that regulate the processes of metabolism, differentiation, proliferation, and apoptosis of cells at the post-transcriptional level are the most valuable candidates for use in this regard. They are found in all biological fluids of the human body, are stable during long-term storage and resistant to changes in environmental conditions. It is known that changes in the miRNA expression profile are closely associated with physical activity, as well as with the administration of recombinant hormones, erythropoiesis-stimulating agents, and other substances and methods that improve sports performance, which are prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA).

**Objective:** In this study, plasma samples from athletes involved in endurance sports (race walking) and non-athletic volunteers were analyzed using a hypoxia signaling pathway panel to identify hypoxia candidate markers.

**Materials and methods:** Expression profiles of plasma circulating miRNAs were assessed by reverse transcription followed by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT Q-PCR). The obtained data were subjected to statistical processing using the CFX Manager Software v3.1 program.

**Results:** Three potential microRNA markers were identified: hsa-miR-210-3p, hsa-miR-320a and hsa-miR-935 (increased in athletes by 61.6 times, 51.8 and 41.0 times, respectively) — of physiological response to the training, load, which may be associated with the emergence of hypoxia during endurance training.

**Conclusion:** We have obtained preliminary data on differences in the expression profiles of circulating miRNAs in healthy non-athletic volunteers and professional athletes in the out-of-competition period. In the future, it is planned to expand the sample of studied blood plasma samples and compare the expression profiles of circulating microRNAs in athletes in competition and out-of-competition periods, as well as to compare the expression profiles of circulating microRNAs during aerobic and anaerobic loads. In addition, it is of interest to analyze changes in the expression levels of circulating miRNAs when using hypoxia mimetics applied to improve sports performance.

**Keywords:** circulating miRNAs, biomarkers, physical activity, efficiency of the training process, endurance, hypoxia, doping control

**Conflict of interests:** The authors declare no conflict of interest.

**For citation:** Pronina I.V., Postnikov P.V., Pavlov V.I., Ordzhonikidze Z.G. Comparison of microRNA expression profiles of athletes involved in endurance sports and non-athletic volunteers using a hypoxia signaling pathway panel. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika (Sports medicine: research and practice)*. 2022;12(2):13–21. (In Russ.) <https://doi.org/10.47529/2223-2524.2022.2.10>

**Received:** 22 February 2022

**Accepted:** 28 July 2022

**Online first:** 5 August 2022

**Published:** 30 September 2022

\* **Corresponding author**

## 1. Введение

Специалисты по спортивной медицине и физиологии тренировочных процессов сходятся в необходимости поиска дополнительных маркеров подготовленности спортсменов к физическим нагрузкам, в частности маркеров выносливости. Выносливость напрямую связана с кислородной емкостью крови, которая достигается высоким уровнем эритроцитов. Давно известно, что выработка эритроцитов регулируется гормоном эритропоэтином, который, в свою очередь, синтезируется при участии факторов, индуцируемых гипоксией (HIF). HIF является ключевым регулятором сигнального пути гипоксии. При нормальном содержании кислорода пролиновые

остатки  $\alpha$ -субъединицы HIF гидроксилируются специфичными диоксигеназами (пролил-4-гидроксилазами, PHD). Гидроксированный HIF- $\alpha$  при помощи PHD направляется на убиквитинирование опосредованное убиквитин-E3-лигазой фон Хиппеля—Линдау (pVHL) и подвергается последующей протеасомной деградации. Помимо этого, механизм подавления HIF обеспечивается фактором, ингибирующим HIF, который по остатку аспарагина гидроксилирует HIF $\alpha$ , препятствуя его взаимодействию с белками-коактиваторами транскрипции (CBP и p300), вследствие чего существенно снижается уровень активации транскрипции генов-мишеней. При возникновении же гипоксии

активность кислородзависимой РНД подавляется,  $\alpha$ -субъединицы HIF перемещаются в ядро и связываются с  $\beta$ -субъединицами HIF, образуя гетеродимерный комплекс. Последний локализуется в чувствительных к гипоксии элементах (HRE) своих генов-мишеней, приводя к усилению их транскрипции. Некоторые из HIF-активированных генов кодируют белки, повышающие физическую работоспособность независимо от эритропоэза (например, гликолитические ферменты, переносчики глюкозы, ангиогенные пептиды).

На протяжении всей своей профессиональной карьеры спортсмены в видах спорта, ориентированных на выносливость, постоянно подвергаются длительной физической нагрузке, ведущей к кислородному голоданию. В связи с этим интересным является исследование факторов, участвующих в регуляции ответа на гипоксию, или регулируемых гипоксией, например микроРНК, при физических нагрузках. Известно, что микроРНК являются тонкими регуляторами экспрессии генов на посттранскрипционном уровне [1]. Изменения профиля циркулирующих микроРНК крови могут быть даже более ранними маркерами ответа на физиологический или патологический стимул, чем биохимические. Как выносливость, так и силовые упражнения модулируют экспрессию микроРНК, кодирующих факторы, участвующие в нескольких клеточных процессах, связанных с адаптацией к тренировкам [2]. В опубликованных работах рассматривается в основном ответ организма спортсмена на тренировку (разовую нагрузку или короткий цикл нагрузок) [3], однако нет работ, посвященных сравнению уровней микроРНК у спортсменов и людей, не занимающихся спортом.

Современные достижения фармацевтической науки, применение новых схем и методов улучшения спортивных результатов заставляют антидопинговое сообщество идти в ногу со временем. Спортсмены изыскивают все более изощренные способы приема запрещенных веществ, например применение низких доз маскирующих агентов или микродоз препаратов, которые не всегда удается успешно детектировать. Разработанные на данный момент методики по обнаружению допинга позволяют оценить состояние и чистоту спортсмена лишь на момент отбора пробы. Исключением является программа биологического паспорта спортсмена, позволяющая отслеживать малейшие колебания параметров крови спортсмена, которые должны быть стабильны, с течением времени [4]. В случае приема допинговых средств, лекарственных препаратов или развития патологических процессов в организме отмечаются изменения данных параметров [5–8]. Проводимые исследования показывают, что изменение уровней экспрессии ряда микроРНК коррелируют с приемом различных активных веществ, как разрешенных, так и запрещенных к применению в спорте. По этой причине у антидопингового и научного сообщества в целом резко возрос интерес к использованию микроРНК в качестве высокочувствительных

маркеров аналогично программе биологического паспорта спортсмена (БПС) [9–13].

Перед тем как проводить выбор конкретных микроРНК, которые могут участвовать в регуляции сигнального пути гипоксии и их возможной валидации для отслеживания уровня тренированности спортсменов или как части программы биологического паспорта спортсмена, желательно провести сравнительный анализ межиндивидуальных различий профилей экспрессии микроРНК. В данной работе проведено сравнение профилей экспрессии микроРНК, выделенных из образцов крови спортсменов, задействованных в видах спорта, ориентированных на выносливость, и добровольцев, не занимающихся спортом.

## 2. Материалы и методы

### Образцы для исследования

Для исследований выбрали образцы замороженной ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) плазмы крови шести добровольцев из числа сотрудников лаборатории, ведущих неспортивный образ жизни (контрольная группа), в возрасте 28–36 лет и шести спортсменов, задействованных в видах спорта, ориентированных на выносливость (в данном случае, спортивная ходьба), во внесоревновательный период (опытная группа). Каждый из добровольцев дал письменное информированное согласие на использование его биологического материала в научных целях, исследование не противоречит Хельсинкской декларации. Образцы крови спортсменов отбирали согласно пункту 5.3.12.2 Международного стандарта для лабораторий (МСЛ) [14] и 6.3 Всемирного антидопингового кодекса [15], в которых говорится, что обезличенные образцы биожидкостей спортсменов могут быть использованы в качестве материала для научных исследований в случае получения предварительного одобрения со стороны атлетов. В данном случае брали замороженные образцы крови, изначально собранные для тестирований по программе гематологического модуля БПС [4]. Образцы крови добровольцев отбирали по правилам сбора образцов по программе БПС в вакуумные пробирки BD Vacutainer® Plus ЭДТА (K2EDTA) для гематологических исследований. Плазму получали центрифугированием при комнатной температуре 20 мин. 1000 g и хранили до исследования при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Выделение микроРНК из образцов плазмы

МикроРНК выделяли из 1 мл плазмы при помощи набора PAXgene Blood miRNA Kit (PreAnalytix, Qiagen, Германия) по протоколу производителя с модификациями. 1 мл плазмы смешивали с 1 мл денатурирующего буфера (2,7 М гуанидина тиоцианат, 1,3 М аммония тиоцианат, 100 мМ натрия ацетат, 5 мМ ЭДТА, pH 4,0), инкубировали при комнатной температуре 20 мин., центрифугировали 10 мин. при 14 000 g, осадок промывали дважды 1 мл деионизированной воды. После второй промывки осадок растворяли в 350 мкл буфера

ВМ1 из указанного выше набора, далее выделение микроРНК вели по протоколу производителя, смывали микроРНК с колонок двумя объемами по 40 мкл деионизированной воды.

Измерение концентрации микроРНК проводили на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием наборов Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Выделенную микроРНК хранили при температуре -20 °С для дальнейшего использования.

#### Обратная транскрипция и количественная ПЦР

Реакцию обратной транскрипции проводили при помощи набора miScript® II RT Kit (Qiagen, Германия) с использованием буфера 5 × miScript HiSpec Buffer по протоколу производителя на приборе C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, США), в реакцию брали 200 нг микроРНК, конечный объем реакционной смеси 20 мкл. Полученную кДНК хранили при -20 °С. Перед

постановкой количественной ПЦР кДНК разводили добавлением 200 мкл деионизированной воды.

Количественную ПЦР проводили с помощью наборов miScript® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Германия) и панелей для исследования профилей экспрессии зрелых микроРНК сигнального пути гипоксии Hypoxia Signaling Pathway miScript® miRNA PCR Array (Qiagen, Германия) (табл.) на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, США). Программа ПЦР: инициация +95 °С 15 мин., 40 циклов (+94 °С 15 сек., +55 °С 30 сек., +70 °С 30 сек.).

#### Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager Software v3.1 (Bio-Rad, США). Данные всех экспериментов были объединены в одно исследование. В работе определяли нормализованную экспрессию микроРНК (ΔCt), нормализацию проводили на референсные РНК.

Таблица

#### Список проанализированных микроРНК

Table

#### List of miRNAs analyzed

1. hsa-let 7a 5p	30. hsa-miR-17-5p	59. hsa-miR-26a-5p
2. hsa-let 7b 5p	31. hsa-miR-181a-5p	60. hsa-miR-26b-5p
3. hsa-let 7c 5p	32. hsa-miR-181b-5p	61. hsa-miR-27a-3p
4. hsa-let 7d 5p	33. hsa-miR-181c-5p	62. hsa-miR-29b-3p
5. hsa-let 7e 5p	34. hsa-miR-184	63. hsa-miR-30b-5p
6. hsa-let 7f 5p	35. hsa-miR-186-5p	64. hsa-miR-30e-5p
7. hsa-let 7g 5p	36. hsa-miR-188-5p	65. hsa-miR-31-5p
8. hsa-let 7i 5p	37. hsa-miR-191-5p	66. hsa-miR-320a
9. hsa-miR 101-3p	38. hsa-miR-192-5p	67. hsa-miR-324-5p
10. hsa-miR 103a 3p	39. hsa-miR-195-5p	68. hsa-miR-331-3p
11. hsa-miR 107	40. hsa-miR-199a-5p	69. hsa-miR-335-5p
12. hsa-miR 10b 5p	41. hsa-miR-199b-5p	70. hsa-miR-34a-5p
13. hsa-miR 122-5p	42. hsa-miR-19a-3p	71. hsa-miR-378a-3p
14. hsa-miR 125a 5p	43. hsa-miR-200a-3p	72. hsa-miR-429
15. hsa-miR 125b 5p	44. hsa-miR-200b-3p	73. hsa-miR-449a
16. hsa-miR 130a 3p	45. hsa-miR-203a-3p	74. hsa-miR-451a
17. hsa-miR 130b 3p	46. hsa-miR-204-5p	75. hsa-miR-491-5p
18. hsa-miR 135a 5p	47. hsa-miR-205-5p	76. hsa-miR-504-5p
19. hsa-miR 138-5p	48. hsa-miR-20a-5p	77. hsa-miR-7-5p
20. hsa-miR 141-3p	49. hsa-miR-20b-5p	78. hsa-miR-877-3p
21. hsa-miR 146a 5p	50. hsa-miR-210-3p	79. hsa-miR-92a-3p
22. hsa-miR 146b 5p	51. hsa-miR-215-5p	80. hsa-miR-935
23. hsa-miR 148a 3p	52. hsa-miR-21-5p	81. hsa-miR-93-5p
24. hsa-miR 148b 3p	53. hsa-miR-221-3p	82. hsa-miR-9-5p
25. hsa-miR 150-5p	54. hsa-miR-22-3p	83. hsa-miR-98-5p
26. hsa-miR 155-5p	55. hsa-miR-224-5p	84. hsa-miR-99a-5p
27. hsa-miR 15a 5p	56. hsa-miR-23a-3p	
28. hsa-miR 15b 5p	57. hsa-miR-23b-3p	
29. hsa-miR 16-5p	58. hsa-miR-24-3p	

По коэффициентам вариации (CV) и значениям среднего геометрического (M-value) в качестве референсных были выбраны SNORD68 (CV 0.3690, M 0.8174), SNORD95 (CV 0.0282, M 0.5652), SNORD96a (CV 0.3951, M 0.8783) со средними величинами стабильности CV 0.2641 и M 0.7537, т.к. для гетерогенных образцов рекомендуется использовать референсные РНК с CV < 0,5 и M < 1,0. При расчете относительной нормализованной экспрессии микроРНК ( $\Delta\Delta Ct$ ) использовались усредненные значения  $\Delta Ct$  опытной группы против контрольной группы. Значимыми признавались величины  $|\Delta\Delta Ct| > 2$  ( $p < 0,01$ ).

### 3. Результаты исследования и их обсуждение

Нами исследована нормализованная экспрессия 84 микроРНК, об участии которых в сигнальных путях гипоксии известно по предыдущим исследованиям согласно информации, собранной в базе данных GeneGlobe Qiagen. В работе сравнили уровень экспрессии микроРНК добровольцев в возрасте 28–36 лет, который приблизительно соответствует среднему возрасту спортсменов, соревнующихся в группе S (senior), и взрослых спортсменов, участвующих в соревнованиях по спортивной ходьбе. Добровольцами выступали сотрудники лаборатории, достоверно не занимающиеся никаким видом спорта и не занимавшиеся спортом ранее. И в группе добровольцев, и в группе спортсменов было по три мужчины и три женщины, таким образом, отличия в профилях экспрессии микроРНК, связанные с полом, исключены.

В результате проведенных экспериментов были отмечены три микроРНК, экспрессия которых достоверно и значимо была выше в группе спортсменов по сравнению с группой добровольцев: hsa-miR-210-3p (повышена в 61,6 раза,  $p = 0,001695$ ), hsa-miR-320a (повышена в 51,8 раза,  $p = 0,006995$ ), hsa-miR-935 (повышена в 41 раз,  $p = 0,001832$ ) (рис. 1). Также отмечено несколько десятков микроРНК, экспрессия которых повышена в сотни раз, например, hsa-let-7b-5p (в 186,31), hsa-let-7c-5p (в 94,28), hsa-miR-122-5p (в 285,28), hsa-miR-203a-3p (в 338,37), hsa-miR-449a (в 369,03), однако уровень значимости определяемой разницы между контрольной и экспериментальной группами  $p > 0,05$ . Низкий уровень значимости данных здесь связан с большой вариабельностью результатов между индивидуумами. Его повышению будет способствовать расширение обеих групп.

МикроРНК hsa-miR-210-3p тесно связана с сигнальным путем гипоксии и активируется в ответ на факторы, индуцируемые гипоксией. Ее экспрессия повышается в клетках, пораженных сердечными заболеваниями и опухолями. Hsa-miR-210-3p, в частности, изучалась на предмет ее влияния на восстановление сердечной функции после инфаркта миокарда посредством повышения регуляции ангиогенеза и ингибирования апоптоза кардиомиоцитов [16].

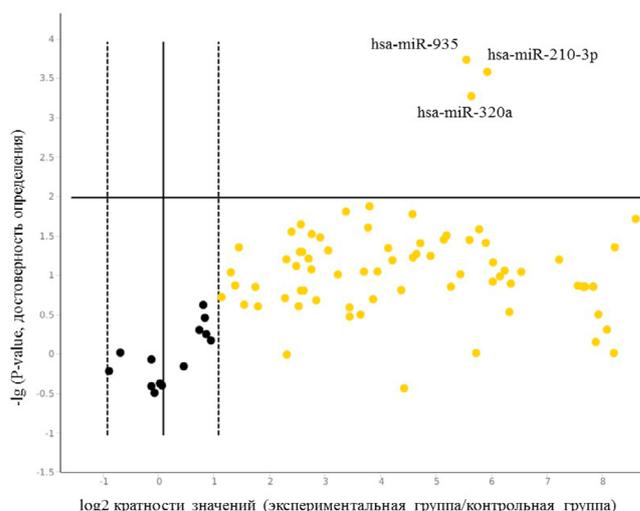


Рис. 1. Относительная нормализованная экспрессия ( $\Delta\Delta Ct$ ) микроРНК, связанных с сигнальными путями гипоксии, в группе спортсменов по сравнению с группой добровольцев. По оси ординат отложены достоверности полученных результатов ( $-\lg(p\text{-value})$ ). Вертикальные пунктирные линии отделяют значимые отклонения ( $|\Delta\Delta Ct| > 2$ , шкала  $\log_2$ ) от незначимых. Горизонтальная линия отделяет результат с высокой достоверностью ( $p \leq 0,01$ ) от результатов с низкой достоверностью

Fig. 1. Relative normalized expression ( $\Delta\Delta Ct$ ) of miRNAs associated with hypoxia signaling pathways in a group of athletes compared with a group of volunteers. The y-axis shows the reliability of the results obtained ( $-\lg(p\text{-value})$ ). Vertical dotted lines separate significant deviations ( $|\Delta\Delta Ct| > 2$ ,  $\log_2$  scale) from insignificant ones. The horizontal line separates a high confidence result ( $p \leq 0.01$ ) from a low confidence result

Инфаркт миокарда — это некроз сердечной ткани, который возникает в результате нарушения кровоснабжения коронарных артерий, вследствие чего клетки лишаются кислорода и питательных веществ (так называемая ишемия). Длительная ишемия в итоге приводит к гибели клеток, а разрушение сердечных клеток приводит к гибели тканей, что может привести к сердечной недостаточности. Доставка miR-210-3p в ишемизированное сердце улучшает функцию сердца, возможно, за счет стимуляции высвобождения ангиогенных факторов, таких как интерлейкин-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и лептин [17]. Однако miR-210-3p также нацелена на гены Efn3 и Ptp1b, которые эндогенно регулируют ангиогенез и апоптоз, соответственно [18–20].

Эфрин-А3 (Efn3) — это ген, который участвует в ингибировании ангиогенеза. Хотя известно, что Efn3 ингибирует образование новых кровеносных сосудов, его конкретная роль до сих пор неизвестна. Hsa-miR-210-3p подавляет Efn3 на уровне мРНК, тем самым позволяя ангиогенезу происходить в сердечной ткани после инфаркта.

Второй ген-мишень, протеинтирозинфосфатаза-1B (Ptp1b), участвует в индукции апоптоза [19–20]. Белок гена Ptp1b, как известно, регулирует апоптоз, влияя на статус фосфорилирования апоптотических белков,

таких как каспаза-3 и каспаза-8. Hsa-miR-210-3p подавляет действие белка Ptp1b, т.е. его проапоптотические функции [21]. Следовательно, подавление работы этих двух генов может способствовать улучшению функционирования сердечной ткани и за счет активации ангиогенеза и ингибирования апоптоза кардиомиоцитов после инфаркта миокарда.

Hsa-miR-320a так же относится к числу мастер-регуляторов сигнального пути гипоксии. Большая часть опубликованных об этой микроРНК данных связана с изучением микроокружения опухолей, в котором она участвует в регуляции апоптоза и ангиогенеза при возникновении гипоксии. При сахарном диабете hsa-miR-320a препятствует возникновению диабетической ретинопатии путем подавления экспрессии белка аквапорина-4 (AQP4) [22].

В работе [23] циркулирующая в плазме miR-320a предложена одним из биомаркеров для диагностики или прогноза сердечных и цереброваскулярных заболеваний. А в работе [24] ее апробировали на животных в качестве потенциального лекарственного средства для терапии ишемических повреждений спинного мозга.

Hsa-miR-320a участвует в регуляции функций эндотелия при физической нагрузке через сигнальный путь MALAT1/miR-320a [25]. Кроме того, hsa-miR-320a регулирует гликолиз в различных биологических

системах [26]. Она взаимодействует с мРНК гликолитического фермента мышц фосфофруктокиназой (PFK<sub>m</sub>, phosphofructokinase type m), что приводит к аккумуляции лактата в тканях. Tang и соавт. показали [26], что манипулирование уровнями экспрессии miR-320a как *in vitro*, так и *in vivo* изменяет уровни PFK<sub>m</sub> и лактата в ожидаемых направлениях.

Hsa-miR-935 практически не изучалась в связи с состоянием гипоксии, однако известно, что одной из ее мишеней является гипоксией индуцируемый фактор-1а (HIF-1а) [27], и уровень циркулирующей в плазме miR-935 снижен у пациентов с артериальной гипертензией. Также hsa-miR-935 участвует в регуляции трансляции 17 генов, ассоциированных с развитием легочной гипертензии [28]. Помимо этого, во многих публикациях обсуждается роль hsa-miR-935 в регуляции экспрессии гена SOX7, участвующего в эмбриональном развитии сердечно-сосудистой системы.

В настоящее время недостаток знаний об межличностных отличиях в профилях экспрессии циркулирующих микроРНК у здоровых людей является препятствием на пути их использования в качестве маркеров уровня физической подготовки спортсменов, антидопинговом тестировании или диагностике различных заболеваний. На рисунке 2 представлен участок диаграммы, отражающей разницу в экспрессии между группой спортсменов

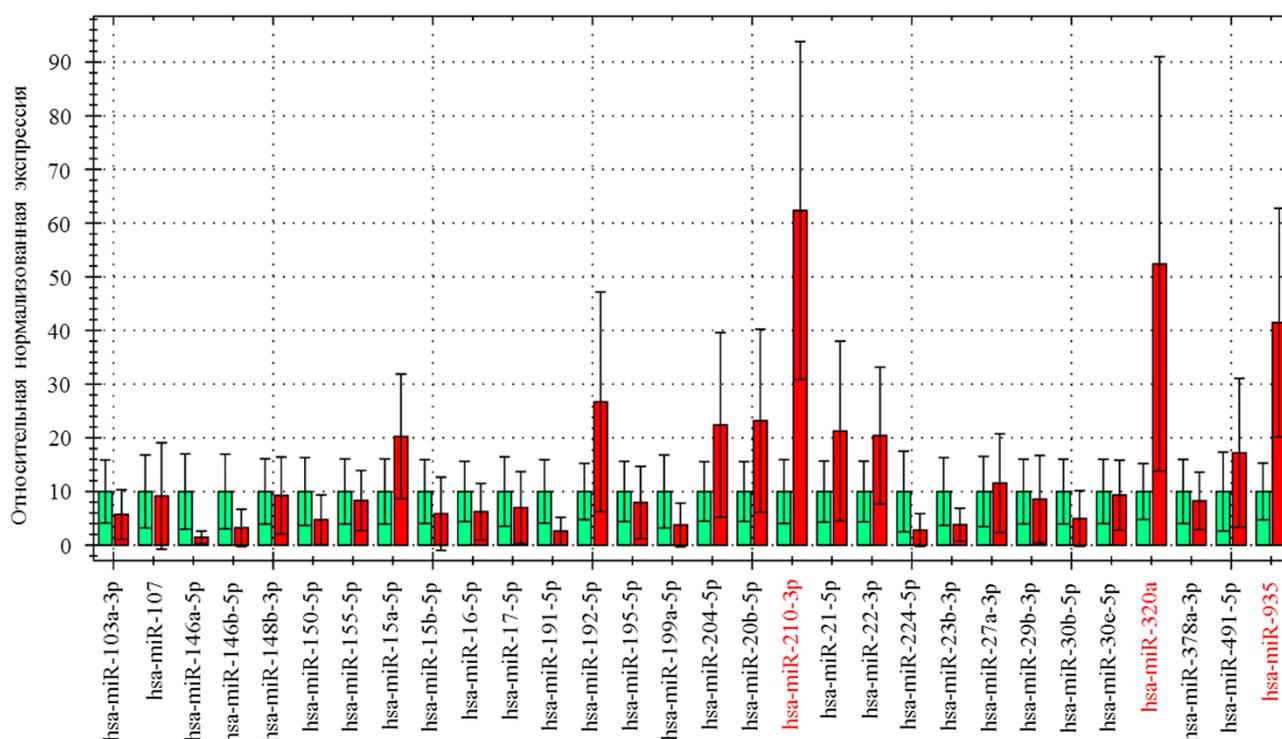


Рис. 2. Диаграмма, отражающая дифференциальную экспрессию отдельных микроРНК в экспериментальной группе (красный цвет) по сравнению с контрольной группой (зеленый цвет). МикроРНК с наиболее значительно повышенной экспрессией выделены красным цветом  
Fig. 2. Diagram showing the differential expression of individual microRNAs in the experimental group (red) compared to the control group (green). MicroRNAs with the most significantly increased expression are highlighted in red

и группой добровольцев. Из диаграммы видно, что многие микроРНК панели сигнального пути гипоксии имеют значительную вариабельность экспрессии.

#### 4. Выводы

Таким образом, нами проведены пилотные исследования по сравнению профилей экспрессии циркулирующих микроРНК плазмы крови у людей, не занимающихся спортом, и выступающих спортсменов. Выявленные нами различия в профилях циркулирующих микроРНК могут быть использованы в качестве индикаторов степени выносливости спортсменов или маркеров эффективности тренировочного процесса. В долгосрочной перспективе эти маркеры могут быть использованы для изучения компенсаторных механизмов организма в ответ на гипоксию.

При расширении выборки исследованных образцов также планируется определить потенциальные микроРНК-маркеры для их дальнейшего возможного применения в программе биологического паспорта спортсмена. Учитывая увеличивающийся интерес спортсменов к применению различных стимуляторов кроветворения и статистику ВАДА по количеству обнаруженных положительных проб за 2019 г. в видах спорта, ориентированных на выносливость [29], особый интерес представляют микроРНК, связанные с сигнальным путем гипоксии. Изменение профилей экспрессии

#### Вклад авторов:

**Пронина Ирина Валерьевна** — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка результатов исследования, написание текста и редактирование статьи.

**Постников Павел Викторович** — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка результатов исследования, написание текста и редактирование статьи, оформление рукописи, утверждение финальной версии статьи.

**Павлов Владимир Иванович** — анализ литературных данных и результатов, общее редактирование статьи.

**Орджоникидзе Зураб Гивиевич** — анализ литературных данных и результатов, общее редактирование статьи, помощь в организации исследований.

#### Список литературы / References

1. Saliminejad K., Khorram Khorshid H.R., Soleymani Fard S., Ghaffari S.H. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J. Cell. Physiol.* 2019;234(5):5451–5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
2. Watier T., Sanchez A.M. Micro-RNAs, Exercise and Cellular Plasticity in Humans: The Impact of Dietary Factors and Hypoxia. *MicroRNA* 2017;6(2):110–124. <https://doi.org/10.2174/2211536606666170519133144>
3. Mounier R., Pialoux V., Schmitt L., Richalet J.-P., Robach P., Coudert J., Clottes E., Fellmann N. Effects of acute hypoxia tests on blood markers in high-level endurance athletes. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2009;106(5):713–720. <https://doi.org/10.1007/s00421-009-1072-z>
4. WADA. Athlete biological passport operating guidelines [internet]. 2021. Available at: <https://www.wada-ama.org/sites/default/>

микроРНК сигнального пути гипоксии может быть связано с тренированностью спортсмена в целом и показателем его выносливости, с нагрузкой, которую он несет в настоящее время, а также с приемом запрещенных препаратов, например солей кобальта, являющихся миметиками гипоксии, и других активаторов гипоксия-индуцируемого фактора. Ввиду того что структура большинства HIF-активаторов закрыта патентами фармацевтических компаний, прямое их определение в допинг-контроле затруднено и об их применении возможно судить только по косвенным маркерам, каковыми могли бы быть микроРНК.

В дальнейшем будет проведено сравнение профилей экспрессии циркулирующих микроРНК в соревновательный и внесоревновательные периоды у спортсменов, сравнение профилей экспрессии циркулирующих микроРНК при аэробных и анаэробных нагрузках. На основании полученных данных возможно будет провести выбор конкретных микроРНК, помимо уже выявленных hsa-miR-210-3p, hsa-miR-320a, hsa-miR-935, участвующих в регуляции сигнального пути гипоксии, как возможной части программы биологического паспорта спортсмена, позволяющей отслеживать малейшие колебания параметров крови спортсмена с течением времени, или выступающих в качестве высокочувствительных маркеров приема запрещенных миметиков гипоксии.

#### Authors' contributions:

**Irina V. Pronina** — the concept and design of the study, collection and processing of the study results, article text writing, editing.

**Pavel V. Postnikov** — the concept and design of the study, collection and processing of the study results, article text writing, editing, article preparation, approval of the final version of the article.

**Vladimir I. Pavlov** — analysis of literature data and results, article general editing.

**Zurab G. Ordzhonikidze** — analysis of literature data and results, article general editing, assistance in research organization.

files/resources/files/guidelines\_abp\_v8\_final.pdf (accessed 25 January 2022).

5. Çakmak H.A., Demir M. MicroRNA and Cardiovascular Diseases. *Balkan Med. J.* 2020;37(2):60–71. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2020.2020.1.94>

6. Kumar S., Vijayan M., Bhatti J.S., Reddy P.H. MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017;146:47–94. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.12.013>

7. Szelenberger R., Kacprzak M., Saluk-Bijak J., Zielinska M., Bijak M. Plasma MicroRNA as a novel diagnostic. *Clin. Chim. Acta.* 2019;499:98–107. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.09.005>

8. Backes C., Meese E., Keller A. Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Mol. Diagn. Ther.* 2016;20(6):509–518. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0221-4>

9. **Leuenberger N., Robinson N., Saugy M.** Circulating miRNAs: a new generation of anti-doping biomarkers. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013;405(30):9617–9623. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7340-0>
10. **Leuenberger N., Saugy M.** Circulating microRNAs: The Future of Biomarkers in Anti-doping Field. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015;888:401–408. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22671-2\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22671-2_20)
11. **Sessa F., Salerno M., Di Mizio G., Bertozzi G., Messina G., Tomaiuolo B., et al.** Anabolic Androgenic Steroids: Searching New Molecular Biomarkers. *Front. Pharmacol.* 2018;9:1321. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01321>
12. **Salamin O., De Angelis S., Tissot J.D., Saugy M., Leuenberger N.** Autologous Blood Transfusion in Sports: Emerging Biomarkers. *Transfus. Med. Rev.* 2016;30(3):109–115. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2016.05.007>
13. **Ponzetto F., Giraud S., Leuenberger N., Boccari J., Nicolli R., Baume N., et al.** Methods for Doping Detection. *Front. Horm. Res.* 2016;47:153–167. <https://doi.org/10.1159/000445177>
14. WADA. International Standard for Laboratories [internet]. 2021. Available at: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl\\_2021.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl_2021.pdf) (accessed 24 January 2022).
15. WADA. World Anti-Doping Code [internet]. 2021. Available at: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021\\_wada\\_code.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021_wada_code.pdf) (accessed 24 January 2022).
16. **Guan Y., Song X., Sun W., Wang Y., Liu B.** Effect of Hypoxia-Induced MicroRNA-210 Expression on Cardiovascular Disease and the Underlying Mechanism. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019;2019:4727283. <https://doi.org/10.1155/2019/4727283>
17. **Huang L., Ma Q., Li Y., Li B., Zhang L.** Inhibition of microRNA-210 suppresses pro-inflammatory response and reduces acute brain injury of ischemic stroke in mice. *Exp. Neurol.* 2018;300:41–50. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.024>
18. **Fasanaro P., D'Alessandra Y., Di Stefano V., Melchionna R., Romani S., Pompilio G., et al.** MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J. Biol. Chem.* 2008;283(23):15878–15883. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800731200>
19. **Hu S., Huang M., Li Z., Jia F., Ghosh Z., Lijkwan M.A., Fasanaro P.** MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation* 2010;122(11 Suppl):S124–S131. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.928424>
20. **Nakamura Y., Patrushev N., Inomata H., Mehta D., Urao N., Kim H.W., et al.** Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell–cell adhesions in endothelial cells. *Circulation Res.* 2008;102(10):1182–1191. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.167080>
21. **Bao Q., Jia H., Rong A., Cao Z., Zhang Y.** MiR-210 inhibits hypoxia-induced apoptosis of smooth muscle cells via targeting MEF2C. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2019;12(5):1846–1858
22. **Chen Z., Yang Z., Li X., Wang H., Wang Y., Ding C., et al.** microRNA-320a prevent Müller cells from hypoxia injury by targeting aquaporin-4. *J. Cell. Biochem.* 2020;121(12):4711–4723. <https://doi.org/10.1002/jcb.29524>
23. **Yang X., Chen H., Chen Y., Birnbaum Y., Liang R., Ye Y., Qian J.** Circulating miRNA Expression Profiling and Target Prediction in Patients Receiving Dexmedetomidine. *Cell. Physiol. Biochem.* 2018;50(2):552–568. <https://doi.org/10.1159/000494168>
24. **Wang Y., Pang QJ, Liu JT, Wu HH, Tao DY.** Down-regulated miR-448 relieves spinal cord ischemia/reperfusion injury by up-regulating SIRT1. *Braz J Med Biol Res.* 2018 Mar 15;51(5):e7319. doi: 10.1590/1414-431X20177319.
25. **Zhao W., Yin Y., Cao H., Wang Y.** Exercise Improves Endothelial Function via the lncRNA MALAT1/miR-320a Axis in Obese Children and Adolescents. *Cardiol. Res. Pract.* 2021;2021:8840698. <https://doi.org/10.1155/2021/8840698>
26. **Tang H., Lee M., Sharpe O., Salamone L., Noonan E.J., Hoang C.D., et al.** Oxidative stress-responsive microRNA-320 regulates glycolysis in diverse biological systems. *FASEB J.* 2012;26(11):4710–4721. <https://doi.org/10.1096/fj.11-197467>
27. **Huang G., Chen J., Liu J., Zhang X., Duan H., Fang Q.** MiR-935/HIF1 $\alpha$  Feedback Loop Inhibits the Proliferation and Invasiveness of Glioma. *Oncotargets Ther.* 2020;13:10817–10828. <https://doi.org/10.2147/OTT.S244409>
28. **Rothman A., Restrepo H., Sarukhanov V., Evans W.N., Wienczek Jr R.G., Williams R., et al.** Assessment of microRNA and gene dysregulation in pulmonary hypertension by endoarterial biopsy. *Pulm. Circ.* 2017;7(2):455–464. <https://doi.org/10.1177/2045893217704206>
29. WADA. 2019 Anti-Doping Testing Figures [internet]. Available at: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2019\\_anti-doping\\_testing\\_figures\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2019_anti-doping_testing_figures_en.pdf) (accessed 24 January 2022).

#### Информация об авторах:

**Пронина Ирина Валерьевна**, к.б.н., главный специалист отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (Института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Россия, 105005, Москва, Елизаветинский пер., 10/1; старший научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>; Web of Science Research ID G-3951-2014; Scopus Author ID 8161867200 ([pronina@dopingtest.ru](mailto:pronina@dopingtest.ru))

**Постников Павел Викторович\***, к.х.н., начальник отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (Института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Россия, 105005, Москва, Елизаветинский пер., 10/1. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3424-0582>; РИНЦ ID 7251-9937 ([postnikov@dopingtest.ru](mailto:postnikov@dopingtest.ru), [drpavelpostnikov@gmail.com](mailto:drpavelpostnikov@gmail.com))

**Павлов Владимир Иванович**, д.м.н., ведущий научный сотрудник, заведующий отделением функциональной диагностики ГАУЗ «Московский научно-практический центр медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины департамента здравоохранения г. Москвы», Россия, 105120, Москва, ул. Земляной Вал, 53. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5131-7401>; Web of Science Research ID B-7057-2019; Scopus Author ID 57193905264; РИНЦ ID 9246-5804 (e-mail: [mnpccsm@mail.ru](mailto:mnpccsm@mail.ru))

**Орджоникидзе Зураб Гивиевич**, д.м.н., заслуженный врач РФ, главный внештатный специалист по спортивной медицине, первый заместитель директора ГАУЗ «Московский научно-практический центр медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины Департамента здравоохранения г. Москвы», Россия, 105120, Москва, ул. Земляной Вал, 53. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4623-0883> (e-mail: [mnpccsm@mail.ru](mailto:mnpccsm@mail.ru))

**Information about the authors:**

**Irina V. Pronina**, Ph.D. (Biology), the main specialist of Doping Control Department of the National Anti-Doping Laboratory (Institute) of Lomonosov Moscow State University, 10/1 Elizavetinsky lane, Moscow, 105005, Russia; senior scientist of pathogenomic and transcriptomic Laboratory of the Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>; Web of Science Researcher ID G-3951-2014; Scopus Author ID 8161867200 (e-mail: [pronina@dopingtest.ru](mailto:pronina@dopingtest.ru));

**Pavel V. Postnikov\***, Ph.D. (Chemistry), the Head of Doping Control Department of the National Anti-Doping Laboratory (Institute) of Lomonosov Moscow State University, 10/1 Elizavetinsky lane, Moscow, 105005, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3424-0582>, e-Library author ID 7251-9937 (e-mail: [drpavelpostnikov@gmail.com](mailto:drpavelpostnikov@gmail.com), [postnikov@dopingtest.ru](mailto:postnikov@dopingtest.ru));

**Vladimir I. Pavlov**, M.D., D.Sc. (Medicine), Head of the Department of Functional Diagnostics of the Moscow Centre for Research and practice in Medical Rehabilitation, Restorative and Sports Medicine of Moscow Healthcare Department, 53 Zemlyanoy Val str., Moscow, 105120, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5131-7401>; Web of Science Research ID B-7057-2019; Scopus Author ID 57193905264; e-Library author ID 9246-5804; ([mnpcsm@mail.ru](mailto:mnpcsm@mail.ru))

**Zurab G. Ordzhonikidze**, D.Sc. (Medicine), Honored Doctor of the Russian Federation, Chief freelance specialist in sports medicine, First Deputy Director of the Moscow Centre for Research and practice in Medical Rehabilitation, Restorative and Sports Medicine of Moscow Healthcare Department, 53 Zemlyanoy Val str., Moscow, 105120, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4623-0883> (e-mail: [mnpcsm@mail.ru](mailto:mnpcsm@mail.ru))

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author