

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ЧЕЛОВЕКА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ОДНОКРАТНЫМ И РЕГУЛЯРНЫМИ СИЛОВЫМИ УПРАЖНЕНИЯМИ

Е. М. Леднев^{1,2}✉, П. А. Махновский², Т. Ф. Вепхвдзе², Р. И. Султанов¹, А. В. Желанкин¹, А. В. Каныгина¹, Д. В. Попов^{1,2}, Э. В. Генерозов¹

¹ Федеральное научно-клиническое центр физико-химической медицины имени Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

Пластичность скелетной мышцы — способность менять морфофункциональные свойства в ответ на изменение сократительной активности. Силовые тренировки ведут к увеличению размеров мышечных волокон и максимальной силы с активацией синтеза белков. Регуляция этих изменений на геномном уровне мало изучена. Целью работы было выявить транскрипционные факторы, ассоциированные с изменением транскриптома скелетной мышцы человека при однократном и регулярных силовых упражнениях. Изменение транскриптомного профиля оценивали в *m. vastus lateralis* 10 молодых мужчин (возраст 23 (20,8–25,9) года) до и после 12-недельной силовой тренировки мышц-разгибателей ног, а также до, через 8 и 24 ч после однократного упражнения. Транскриптомные профили оценивали методом РНК секвенирования, поиска мотивов связывания и ассоциированных транскрипционных факторов. Использовали биоинформатические методы статистики, программы FastQC, GraphPad Prism 8, DAVID, R. Длительная силовая тренировка привела к обогащению функциональных групп генов «секретируемые белки», «внеклеточный матрикс» и «базальная мембрана» ($p < 0,05$). Транскриптомные ответы и ассоциированные транскрипционные факторы различались через 8 и 24 ч после однократной нагрузки, а также после регулярных тренировок. Транскрипционные факторы, участвующие в адаптации к длительной и однократной нагрузке, участвуют в миогенезе, ангиогенезе, регуляции фенотипа волокон, протеостазе и иных процессах. Таким образом, регуляция экспрессии генов при адаптации к силовым нагрузкам — сложный процесс с участием множества транскрипционных факторов с разными функциями. Изучение роли этих факторов в адаптации скелетной мышцы к упражнениям является перспективной задачей.

Ключевые слова: экспрессия генов, силовая тренировка, мышечная пластичность, мышечные волокна, гипертрофия

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, соглашение № 21-15-00362 «Исследование молекулярно-генетических механизмов морфофункциональных изменений мышечных волокон человека в ходе высокоинтенсивных физических нагрузок».

Вклад авторов: Е. М. Леднев, Т. Ф. Вепхвдзе — организация и проведение исследования, взятие мышечных биопсий; П. А. Махновский, Р. И. Султанов и А. В. Каныгина — биоинформатический анализ данных; А. В. Желанкин, Е. М. Леднев — выполнение лабораторных исследований; Э. В. Генерозов, Д. В. Попов — организация и проведение исследования, обработка данных, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России (номер протокола № 202/06/01 от 01 июня 2021 г.). Все испытуемые подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Егор Михайлович Леднев
Хорошевское шоссе, д. 76А, г. Москва, 123007, Россия; ledhauz@gmail.com

Статья получена: 21.07.2023 **Статья принята к печати:** 01.09.2023 **Опубликована онлайн:** 27.09.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.031

TRANSCRIPTION FACTORS IN HUMAN SKELETAL MUSCLE ASSOCIATED WITH SINGLE AND REGULAR STRENGTH EXERCISES

Lednev EM^{1,2}✉, Makhnovskii PA², Vepkhvadze TF², Sultanov RI¹, Zhelankin AV¹, Kanygina AV¹, Popov DV^{1,2}, Generezov EV¹

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Institute for Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Skeletal muscle plasticity is the ability to change morphofunctional properties in response to changes in contractile activity. Strength training increases the size of muscle fibers and maximum strength with the activation of protein synthesis. Regulation of these changes at the gene level has not been investigated properly. This study aimed to identify transcription factors associated with changes in the transcriptome of the human skeletal muscle in the context of single and regular strength exercises. We assessed changes in the transcriptomic profile of *m. vastus lateralis* of 10 young men (mean age 23 (20.8 - 25.9) years) before and after 12-week leg extensor muscles strength training course, as well as before, 8 and 24 hours after a single exercise. Transcriptomic profiling involved RNA sequencing, search for binding motifs and the associated transcription factors. Bioinformatic methods of statistics, FastQC, GraphPad Prism 8, DAVID, R enabled analysis of the data acquired. The strength training course resulted in the enrichment of the functional groups of genes "secreted proteins", "extracellular matrix" and "basal membrane" ($p < 0.05$). Transcriptomic responses and the associated transcription factors differed 8 and 24 hours after a single session as well as after regular training sessions. Transcription factors involved in adjustment to regular and one-time loads participate in myogenesis, angiogenesis, regulation of fiber phenotype, proteostasis and other processes. Thus, regulation of gene expression during adjustment to the resistance training loads is a complex process that involves many transcription factors with different functions. Investigation of the role played by these factors in the context of adjustment to exercising is a potentially rewarding task.

Keywords: gene expression, strength training, muscle plasticity, muscle fibers, hypertrophy

Funding: the study was supported financially by the Russian Science Foundation, Agreement № 21-15-00362 "Investigation of molecular genetic mechanisms of morphofunctional changes in human muscle fibers during high-intensity physical loads".

Author contribution: Lednev EM, Vepkhvadze TF — study design and conduct, muscle sampling; Makhnovskii PA, Sultanov RI and Kanygina AV — bioinformatic data analysis; Zhelankin AV, Lednev EM — laboratory research; Generezov EV, Popov DV — study design and conduct, data processing, article authoring.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Lopukhin Federal Research and Clinical Center Of Physical-Chemical Medicine (Minutes № 202/06/01 of June 01, 2021). All participants signed the voluntary informed consent form.

✉ **Correspondence should be addressed:** Egor M. Lednev
Khoroshevskoe sh., 76A, Moscow, 123007, Russia ledhauz@gmail.com

Received: 21.07.2023 **Accepted:** 01.09.2023 **Published online:** 27.09.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.031

Одной из отличительных особенностей ткани скелетных мышц является пластичность — способность изменять свои морфофункциональные характеристики в ответ на изменение уровня сократительной активности. Изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе пластичности, является фундаментальной задачей и имеет важное прикладное значение для оптимизации тренировочных программ в физической культуре и спорте, а также для профилактики негативного влияния различных заболеваний на скелетную мускулатуру. С одной стороны, высокоинтенсивная силовая нагрузка вызывает транзиторное увеличение mTORC1-зависимой скорости синтеза мышечных белков [1–3], благодаря чему регулярное применение таких нагрузок приводит к увеличению размеров мышечных волокон и мышцы и максимальной силы, развиваемой мышцей. С другой стороны, однократная силовая нагрузка [4–7] и регулярные силовые тренировки различной длительности [4, 6–11] изменяют профиль генной экспрессии в тренируемой скелетной мышце. При этом механизмы, регулирующие эти изменения (в частности, транскрипционные факторы, ассоциированные с изменением транскриптомного профиля), исследованы недостаточно.

Целью нашей работы был поиск транскрипционных факторов, ассоциированных с изменением транскриптома скелетной мышцы человека при однократном и регулярных силовых упражнениях. Для этого с помощью РНК секвенирования мы исследовали изменение транскриптомного профиля в биоптатах *m. vastus lateralis* у 10 молодых мужчин после 12-недельной силовой тренировки мышц-разгибателей ног в коленном суставе, а также через 8 ч и 24 ч после однократной силовой нагрузки (рис. 1).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Организация исследования

В исследовании участвовало десять молодых мужчин в возрасте 23 (20,8–25,9) года, с ИМТ 22 (20,9–25,1) кг/м². Критерии включения: полностью здоровые; отсутствие острых и хронических заболеваний; отсутствие опыта длительных силовых тренировок; отсутствие травм и операций в области спины и нижних конечностей. Критерии исключения: отказ от участия в тренировочных

сессиях и тестовых манипуляциях; выявление нежелательных угрожающих здоровью и жизни состояний в ходе тренировок или манипуляций; нарушение рекомендованного режима питания или злоупотребление вредными привычками в ходе эксперимента. Участники в течение 12 недель тренировали мышцы-разгибатели ног в упражнении «жим платформы обеими ногами в положении сидя». До начала эксперимента был выполнен опрос участников, все испытуемые сообщили о разнообразном и регулярном питании с достаточным количеством потребляемых белков, жиров и углеводов, адекватным количеством потребляемой жидкости в течение дня. В ходе эксперимента всем участникам было рекомендовано придерживаться обычного для них пищевого режима. Все участники не курили ранее и на момент проведения эксперимента, а также не употребляли каких-либо биологически активных добавок за 3–4 месяца до и на протяжении исследования. Вегетарианцы и веганы в эксперименте участие не принимали. Увеличение мышечной массы при регулярных силовых тренировках зависит, прежде всего, от того, что каждое упражнение (подход) выполняется до выраженного утомления (до отказа), а не от величины используемой нагрузки [12]; при этом оптимальная для роста мышечной силы тренировочная программа состоит из 25 рабочих подходов за тренировку и не менее чем двух тренировок в неделю [13, 14]. Поэтому в нашем исследовании добровольцы тренировались 3 раза в неделю с чередованием нагрузок разной интенсивности: понедельник (65% максимальной произвольной силы, до отказа) — три подхода, среда (50% МПС, 25 повторов) — три подхода и пятница (75% МПС, до отказа) — четыре подхода; подходы разделяли четыре минуты отдыха. Помимо этого, каждая тренировочная сессия включала разминку (50% МПС, 12 повторов). Все участники эксперимента сообщили о средней продолжительности сна около 8 ч в сутки, в ходе эксперимента испытуемые не сообщали об изменениях в их режиме сна. Всем испытуемым рекомендовали умеренный и привычный для них режим физической активности на протяжении 24 ч после каждого тренировочного занятия и воздержание от употребления алкоголя на протяжении 24–48 ч восстановления после тренировок.

Перед тренировочным периодом проводили биопсию из *m. vastus lateralis* (рис. 1; Б1). Через 2 дня проводили ознакомительное занятие и еще через 2 дня определяли

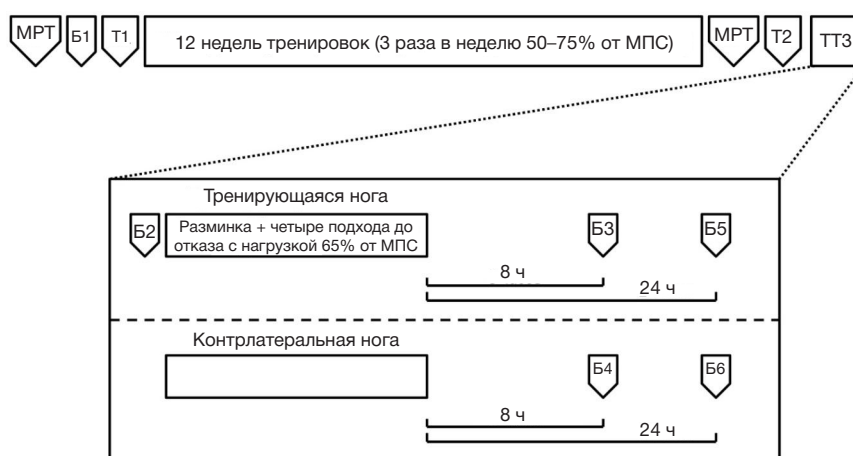


Рис. 1. Схема физиологического эксперимента. Т1, Т2 — тесты для оценки максимальной произвольной силы (МПС); ТТ3 — тестовое тренировочное занятие (однократное тренировочное занятие со взятием биопсических проб из обеих ног до и после выполнения упражнений одной ногой); Б1–Б6 — взятие материала для биопсии из латеральной головки четырехглавой мышцы бедра (*m. vastus lateralis*). Материал для биопсии Б1, Б2, Б3, Б5 были взяты из ноги, нагружаемой во время ТТ3. Биопсии Б4 и Б6 — из контрлатеральной не работавшей ноги. Во время 12 недель тренировок тренировали обе ноги

МПС как наибольшую нагрузку, при которой доброволец мог выполнить полное разгибание обеих ног. МПС оценивали каждые 2–3 недели во время, а также после тренировочного периода (рис. 1; T2). Отдельно определяли МПС той ноги, которая в дальнейшем работала во время тестового тренировочного занятия (ТТЗ); для снижения эффекта доминантной конечности ногу для ТТЗ выбирали в случайном порядке (рис. 1; T1). Через 4 дня добровольцы выполняли ТТЗ с упражнением «жим платформы одной ногой в положении сидя» (рис. 1): разминка (50% МПС, 12 повторов) + (65% МПС, до отказа) — четыре подхода. Через 8 ч и 24 ч после окончания занятия брали пробы мышечной ткани при помощи биопсии из *m. vastus lateralis* работавшей и неработавшей ног. Изменение генного ответа через несколько часов после нагрузки может быть связано не только с мышечным сокращением, но и с действием системных факторов (циркадные осцилляции, питание и т. п.) [15,16]. В нашей работе для исключения влияния системных факторов на генную экспрессию после однократной нагрузки мы оценивали различия транскриптомного профиля в пробах, полученных из работавшей мышцы и не работавшей (контрольной) мышцы контралатеральной конечности.

Весь биопсийный материал отбирали после 30 мин покоя в положении лежа из средней трети *m. vastus lateralis* под локальной анестезией (2 мл 2%-го лидокаина) с помощью 6 мм модифицированной иглы Бергстрёма с аспирацией [17]. Каждый последующий биопсийный образец брали на 4 см проксимальнее предыдущего. Полученные образцы ткани быстро очищали от крови и соединительной ткани, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

Транскриптомный анализ

Образцы мышечной ткани (~20 мг) гомогенизировали с помощью гомогенизатора TissueLyser II (Qiagen; ФРГ) в режиме два цикла по 1 мин при частоте 30 Гц, РНК выделяли с использованием набора RNeasy mini kit (Qiagen; ФРГ).

Таблица 1. Результаты анализа функционального обогащения для генов, изменивших экспрессию в *m. vastus lateralis* после тренировочного периода и в ответ на однократную тренировочную нагрузку

Сравнение	Термин UniProt	P_{adj}	Число генов	Гены
После/до тренировочного периода	Secreted (секретируемые белки)	5,40E-12	39	COL15A1, SPARC, PCOLCE2, LAMA4, HTRA1, F13A1, C10RF54, CHRDL1, NID2, FSTL1, THBS4, SERPINA5, CNPY4, CTSK, PENK, S100A13, CCN1, PAMR1, POSTN, CD163, IGFBP3, LAMB1, RNASE1, PLXDC1, ASPN, FNDC5, MFAP5, COL1A1, SFRP4, SMOC2, COL3A1, COL1A2, FNDC1, TCN2, COL5A2, MGP, SAA1, S100A4, MASP1
	Extracellular matrix (внеклеточный матрикс)	1,70E-06	14	POSTN, COL15A1, SPARC, LAMA4, LAMB1, NID2, ASPN, THBS4, MFAP5, COL1A1, SMOC2, COL3A1, COL1A2, COL5A2
	Basement membrane (базальная мембрана)	0,0098	5	SMOC2, SPARC, LAMA4, LAMB1, NID2
Работающая/ неработающая мышца, 8 ч после упражнения	—	n.s.	—	—
Работающая/ неработающая мышца, 24 ч после упражнения	Cytoskeleton (цитоскелет)	0,0087	64	RIPOR2, RIF1, WDR1, CBY1, HSPB1, HNRNPU, NR3C1, TUBA1C, TUBA1B, CSRP3, TUBA1A, SGCD, MPRIIP, CEP250, CEP170, DYNLT1, TUBB, ANXA11, CSNK1D, PPP4R3B, ANK3, RANGAP1, MLF1, TUBA4A, ACTA2, KAT2B, KIF9, PALLD, EVL, EZR, PFN1, FKBP4, MACF1, DCTN4, CEP85L, PXN, UACA, AURKA, FGD4, TTC21B, FLNB, CEP192, FLNC, OCT5, MAP2K6, CEP350, RAB31P, SYNJ2, PARVB, ARHGAP26, ARHGAP24, SEPTIN7, RAB10, DIAPH1, KITLG, TTLL4, ACTC1, APPBP2, KATNBL1, JMY, SPIRE1, PKN2, PTPN4, CALM2

Концентрацию РНК оценивали с помощью флуориметра Qubit 3.0 (Thermo Scientific; США), а целостность РНК — с помощью капиллярного электрофореза (Bioanalyzer 2100, Agilent; США). Очистку РНК от контаминации ДНК проводили с использованием набора Turbo DNA-free Kit (Thermo Scientific, США). Синтез двухцепочечной кДНК осуществляли с использованием набора Mint-2 («Евроген»; РФ). Очистку полученного ПЦР-продукта проводили методом SPRI на AMPure XP beads (Beckman-Coulter; США), фрагментацию дцкДНК — при помощи ультразвукового устройства ME220 (Covaris; США) в режиме получения дцкДНК фрагментов размером 250 пн в стрипах по восемь пробирок в объеме 50 мкл (Peak Incident Power 75W, Duty Factor 20%, Cycles per Burst 1000, Treatment Time 75 s). Полученные фрагменты дцкДНК также очищали методом SPRI на AMPure XP beads (Beckman-Coulter; США).

Для подготовки библиотек для 10 нг фрагментов полученной дцкДНК использовали набор Universal DNA Library Prep Set (MGI-Tech; KHP). Протокол включал репарацию и фосфорилирование концов фрагментов, лигирование асимметричных адаптеров и 4–7 циклов амплификации продуктов лигирования для количественной наработки библиотек. Секвенирование РНК проводили на анализаторе DNBseq-G400 (MGI; KHP) в соответствии с инструкциями производителя с использованием набора реагентов DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Set PE100 с длиной прочтения 100 нуклеотидов и глубиной 50 млн пар прочтений на образец.

Биоинформатическая обработка данных РНК-секвенирования

Контроль качества данных секвенирования проводили при помощи программы FastQC v0.11.9 (Babraham Institute; Великобритания). Прочтения низкого качества и адаптерную последовательность удаляли из анализа с помощью программы Trimmomatic v0.39 (USADLLAB; США) при стандартных параметрах. Парные прочтения картировали на референсный геном человека версии

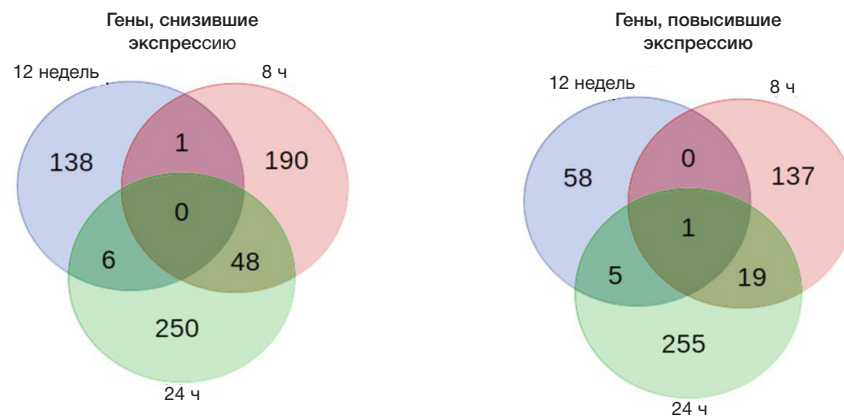


Рис. 2. Число генов, изменивших экспрессию в *m. vastus lateralis* после 12-недельной тренировочной программы, а также через 8 ч и 24 ч после однократного тренировочного занятия. Круговые диаграммы показывают количество мРНК, уникальных и общих для разных экспериментальных условий для генов, увеличивших и снизивших экспрессию

GRCh38.p13 (genecode v37) с помощью программы STAR v2.7.4a (Cold Spring Harbor Laboratory, США) при стандартных параметрах. Количество уникальных прочтений для экзонов каждого гена определяли при помощи функции featureCounts пакета Rsubread (язык программирования R, Lucent Technologies, США) с использованием аннотации генома genecode v37.

Для поиска дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) между группами сравнения использовали пакет DESeq2 языка программирования R (Lucent Technologies; США). Порог для определения ДЭГ составлял $\text{Padj} < 0,1$ (скорректированное p -значение с поправкой Бенджамини–Хохберга). Для анализа функционального обогащения ДЭГ использовали инструмент DAVID (Frederick National Laboratory for Cancer Research; США), используя базы данных биологических процессов и клеточных компартментов UniProt.

Для поиска транскрипционных факторов, потенциально регулирующих экспрессию генов в ответ на силовые упражнения, и соответствующих мотивов связывания были проанализированы промоторные области ДЭГ (области открытого хроматина вокруг старта инициации транскрипции, определенные для скелетной мышцы и опубликованные ранее [18]). Поиск мотивов (и ассоциированных с ними транскрипционных факторов) проводили с помощью платформы GeneXplain, используя базу данных позиционных весовых матриц TRANSFAC v2022.1, как описано ранее [18]. Максимальное обогащение (FEadj , скорректированное отношение шансов частот сайтов при доверительном интервале 99%) было определено для каждой позиционной весовой матрицы (PWM) относительно случайного набора 5000 промоторов. Скорректированная величина обогащения (FEadj) $> 1,5$ для сайтов связывания с транскрипционными факторами (биномиальный тест) и $\text{FDR} < 0,05$ были выбраны в качестве критериев значимости.

Статистическая обработка

Для оценки изменения МПС после тренировок использовали программу GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Dotmatics; США), критерий Уилкоксона, пороговое значение $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Двенадцать недель силовых тренировок увеличили максимальную произвольную силу в 1,19 раз ($p = 0,002$),

что сопоставимо с результатами работ с аналогичным дизайном тренировок [19, 20]. Это свидетельствует об эффективности используемой нами тренировочной программы.

Влияние регулярных силовых тренировок на изменения базального транскриптома

Тренировки привели к изменению базальной (утром натощак) экспрессии 209 генов, из которых 145 мРНК увеличили и 64 мРНК снизили содержание (сравнение Б2–Б1; рис. 1). Анализ функционального обогащения выявил значимое обогащение для функциональных терминов «внеклеточный матрикс», «секретируемые белки» и «базальная мембрана». Среди этих генов были различные коллагены, кальмодулин-подобные белки и молекулы адгезии (табл. 1). Такой результат, несмотря на небольшой объем изменений, хорошо согласуется с данными метаанализов изменений транскриптома в ответ на регулярные силовые тренировки [21, 22]. С одной стороны, вероятно, активация экспрессии генов белков внеклеточного матрикса является одним из механизмов, участвующих в адаптации тренируемой скелетной мышцы к регулярным силовым тренировкам. С другой стороны, в нашей и в других работах отмечено относительно слабое влияние длительных силовых тренировок на транскриптом скелетной мышцы, даже при длительности тренировок в 15 и более лет [23]. Это может быть связано с тем, что силовые упражнения активируют, прежде всего, трансляцию, а не транскрипцию.

Изменение транскриптома в ответ на однократное силовое упражнение

Через 8 ч и 24 ч после однократной силовой нагрузки изменилось содержание 396 и 584 мРНК соответственно, больше половины из них увеличили экспрессию: 239 мРНК и 304 мРНК соответственно. Наборы генов, изменивших экспрессию на 8 ч и 24 ч после однократной нагрузки, пересекались слабо (рис. 2). При анализе обогащения не выявлено функциональных категорий через 8 ч после нагрузки. Тем не менее, обнаружена активация экспрессии ряда генов, известных по предыдущим работам как маркеры раннего ответа на сократительную активность (в т. ч. при аэробных упражнениях): *ATF3*, *DDIT3*, *JUND*, *MAFF*, *NR4A3*, *VDR*, *PRKAG2*, *PPARGC1A* и др. [22, 24–26]. Гены, изменившие экспрессию через 24 ч после однократной нагрузки, были ассоциированы

ТФ, ассоциированные
с генами, понизившими
экспрессию

Трен.	+8 ч	+24 ч		Трен.	+8 ч	+24 ч	
FOXJ2	1.51			FOX	1.52		TALE-type HD
FOXP1	1.95			FOX	1.64		TALE-type HD
RELA	1.50			Nf-kappaB-related	1.52		E2A
NFATC1	1.62			NFAT-related	1.60		MyoD-ASC-related
NFATC3	1.65			NFAT-related	1.86		MyoD-ASC-related
NFATC4	1.62			NFAT-related	1.72		Tal-related
STAT6	1.51			STAT		1.87	SOX
TBP	1.78		1.65	TBP-related			SOX
ZNF713	1.52			C2H2 zinc finger factors		1.62	SOX
ZFP3	1.61			C2H2 zinc finger factors		1.52	Nf-kappaB-related
ZNF677	1.50			C2H2 zinc finger factors		1.76	TBP-related
ZBTB45	2.64			C2H2 zinc finger factors		1.60	FOX
ZNF362	2.21			C2H2 zinc finger factors		1.56	FOX
ZNF384	1.68			C2H2 zinc finger factors		1.69	FOX
ZNF260	1.89			C2H2 zinc finger factors			FOX
ZFP30	2.63			C2H2 zinc finger factors		1.83	FOX
ZNF354A	1.68			C2H2 zinc finger factors	1.76		C2H2 zinc finger factors
ZNF611	2.31			C2H2 zinc finger factors	1.56		C2H2 zinc finger factors
ZNF251	1.51			C2H2 zinc finger factors		1.55	C2H2 zinc finger factors
ZNF224		1.63		C2H2 zinc finger factors			C2H2 zinc finger factors
ZNF569		1.60		C2H2 zinc finger factors			C2H2 zinc finger factors
ZNF16			2.08	C2H2 zinc finger factors			C2H2 zinc finger factors
ZBTB11			1.53	C2H2 zinc finger factors			C2H2 zinc finger factors
ERG	1.74			C2H2 zinc finger factors			C2H2 zinc finger factors
SOX18	1.52			Ets-related			C2H2 zinc finger factors
HBP1		1.67		SOX			CEBP-related
MEF2A	1.52			SOX			DMRT
POU6F1	1.70			MADS box factors		2.01	ARID-related
MSX2	1.50			POU			
HOXA13	1.68			NK			
HOXA10	1.61			HOX			
HOXA6		1.75		HOX			
HOXB6		1.54		HOX			
HOXB7		2.31		HOX			
JUN		2.00		HOX			
JUNB		1.95		HOX			
JUND		1.86		HOX			
BACH1		1.89		HOX			
BACH2		2.02		HOX			
FOS		1.97		HOX			
FOSL2		2.34		Jun-related			
ATF3		2.35		Jun-related			
JDP2		1.87		Jun-related			
MAF		1.79		Jun-related			
MAFK		1.95		Fos-related			
ATF4		2.21		Fos-related			
CREB1		1.52		Fos-related			
MSC		1.68		Fos-related			
TFAP4		1.51		Maf-related			
ESR1		1.65		Maf-related			
PPARG		1.66		Maf-related			
IRX3		1.98		ATF4			
PKNOX1		1.59		CREB-related			
SATB1			1.56	Tal-related			
ETS2			1.76	BHLH-ZIP			
GMEB2			1.68	Steroid hormone receptors			
CEBPA	1.79		2.72	Thyroid hormone receptors			
CEBPB	1.78		1.64	TALE-type HD			
CEBPD	1.91		1.59	TALE-type HD			
CEBPG	1.51	1.98		HD-CUT			
DDIT3		1.78		Ets-related			
DBP			1.59	GMEB			
HLF			1.63	CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			
				CEBP-related			

Так, после 12-недельного периода силовых тренировок обеих ног мы выявили изменение транскриптомного профиля *m. vastus lateralis*, сопоставимое с тем, что описано ранее в подобных исследованиях. Используя

каждом из исследуемых экспериментальных условий, представлены на рис. 3. При адаптации к регулярным силовым тренировкам изменение базальной экспрессии генов в *m. vastus lateralis* было ассоциировано с разнообразными семействами транскрипционных регуляторов; наиболее обогащенными из них оказались малоизученные факторы с доменами цинковых пальцев. Помимо этого, был выявлен ряд факторов, изменение активности которых после регулярных силовых тренировок было вполне ожидаемо. Так, активация экспрессии генов была ассоциирована с факторами, непосредственно связанными с сократительной активностью, например, NFATC — компонент Ca^{2+} -зависимого кальциневрин–NFAT-сигнального пути [27]. Известно, что NFATC1 может контролировать рост мышц [28–30] и соотношение типов мышечных волокон у мышей, а также подавлять активность MyoD-зависимых промоторов [31].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регулярные физические упражнения приводят к активации экспрессии генов внеклеточного матрикса, в том числе генов, кодирующих белки — регуляторы ангиогенеза. Среди обнаруженных нами транскрипционных факторов потенциальными регуляторами ангиогенеза являются ERG и SOX18. Известно, что ERG регулирует ангиогенез, контролируя экспрессию E-кадгерина и сигнальный путь Wnt/ β -catenin [27]. SOX18 экспрессируется преимущественно в эндотелиальных клетках и регулирует ангиогенез за счет активации их миграции и пролиферации, при этом паттерн экспрессии SOX18 в эндотелиальных клетках совпадает с VEGFA и его рецептором [32]. Среди факторов, ассоциированных с увеличением генной экспрессии, ожидаемо был найден регулятор миогенеза MEF2A, а также MSX2. Неожиданно, снижение экспрессии некоторых генов было ассоциировано с миогенными E-box-связывающими факторами (MYOG, MYF5, MSC), контролирующими дифференцировку миоцитов на разных этапах. Можно предположить, что увеличение активности одних миогенных факторов и подавление других связано с изменением фенотипа мышцы после тренировки. Известно, что подобные программы силовых тренировок приводят к преимущественному увеличению размеров мышечных волокон типа II и оказывают слабое влияние на волокна типа I [1].

Функции других транскрипционных факторов, ассоциированных с изменением транскрипционного профиля при регулярных силовых тренировках, оценить сложно. Так, FOXP1 описан как репрессор транскрипции, его сверхэкспрессия вызывает атрофию и потерю мышечной массы у мышей [33]. Помимо этого, FOXP1 ингибирует активность MyoD [34]. RELA и STAT6 известны в качестве регуляторов воспаления, однако они также играют роль в регуляции миогенеза и атрофии [35, 36].

Через 8 ч после однократного упражнения регуляция экспрессии генов была связана, прежде всего, с

факторами класса bZIP (семейства факторов раннего ответа JUN, FOS, MAF и др.). Известно, что некоторые из них (ATF4, AP-1 факторы (FOS, JUN), DDIT3, CEBP) активируются при нарушении протеостаза и ЭПР-стрессе [37, 38]. Активация этих факторов достаточно ожидаема, поскольку высокоинтенсивные силовые упражнения вызывают выраженный метаболический и механический стресс; примечательно, что активация этих факторов не обнаружена на более поздних этапах восстановления (24 ч) после однократного тренировочного занятия. Напротив, снижение экспрессии генов на 8-м ч восстановления было ассоциировано с факторами семейства FOXO, которые в мышце регулируют активность убиквитин-протеасомной системы [39–41].

Через 24 ч после упражнения изменение генной экспрессии было ассоциировано с небольшим количеством транскрипционных факторов: увеличение, главным образом, с факторами семейства CEBP, а подавление — с факторами, содержащими домены цинковых пальцев, в частности KRAB-домен содержащий репрессор RBK.

Таким образом, мы показали, что наборы генов, изменивших экспрессию в ответ на 12-недельную силовую тренировку и на однократное тренировочное занятие, и ассоциированные с ними транскрипционные факторы достаточно уникальны. Это, по-видимому, связано с наличием множества сигнальных путей, регулирующих активацию различных наборов транскрипционных факторов и их генов-мишеней в базальном состоянии после периода регулярных аэробных тренировок и на разных этапах восстановления после однократного тренировочного занятия. Для некоторых транскрипционных факторов, предсказанных в нашей работе, в литературе описана их роль в регуляции миогенеза, что косвенно характеризует корректность используемого нами биоинформатического анализа. Роль других транскрипционных факторов в регуляции миогенеза не столь очевидна. Изучение роли этих факторов в адаптации скелетной мышцы к высокоинтенсивным упражнениям, стимулирующим рост мышечной массы, представляется перспективной задачей.

ВЫВОДЫ

Показаны выраженные изменения в транскриптом скелетной мышцы в ответ на однократную силовую нагрузку и на 12-недельную силовую тренировку, сопровождаемую ростом силовых возможностей тренируемых мышц. Эти изменения хорошо сопоставимы с результатами других работ со схожими тренировками. Примечательно, что транскриптомные ответы и ассоциированные с ними транскрипционные факторы выражено различались как через 8 ч и 24 ч после однократной нагрузки, так и после 12-недельного периода регулярных тренировок. Согласно полученным результатам, регуляция экспрессии генов при адаптации к силовым нагрузкам имеет сложный характер, что, по-видимому, обусловлено большим количеством процессов, вовлеченных в регуляцию роста мышечной массы.

Литература

1. Виноградова О. Л., Попов Д. В., Нетреба А. И., Цвиркун Д. В., Курочкина Н. С., Бачинин А. В. и др. Оптимизация процесса физической тренировки: разработка новых “щадящих” подходов к тренировке силовых возможностей. Физиология человека. 2013; 39: 71–85. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.7868/S0131164613050172>.
2. Solsona R, Pavlin L, Bernardi H, Sanchez AMJ. Molecular regulation of skeletal muscle growth and organelle biosynthesis:

- Practical recommendations for exercise training. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 1–31. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22052741>.
3. Mesquita PHC, Vann CG, Phillips SM, McKendry J, Young KC, Kavazis AN, et al. Skeletal muscle ribosome and mitochondrial biogenesis in response to different exercise training modalities. *Front Physiol.* 2021; 12. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.725866>.
 4. Gordon PM, Liu D, Sartor MA, IglayReger HB, Pistilli EE, Gutmann L, et al. Resistance exercise training influences skeletal muscle immune activation: a microarray analysis. *J Appl Physiol.* 2012; 112: 443–53. Available from: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00860.2011>.
 5. Dickinson JM, D'Lugos AC, Naymik MA, Siniard AL, Wolfe AJ, Curtis DP, et al. Transcriptome response of human skeletal muscle to divergent exercise stimuli. *J Appl Physiol.* 2018; 124: 1529–40. Available from: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00014.2018>.
 6. Damas F, Ugrinowitsch C, Libardi CA, Jannig PR, Hector AJ, Mcglory C, et al. Resistance training in young men induces muscle transcriptome-wide changes associated with muscle structure and metabolism refining the response to exercise-induced stress. *Eur J Appl Physiol.* 2018; 118: 2607–16. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00421-018-3984-y>.
 7. Raue U, Trappe TA, Estrem ST, Qian HR, Helvering LM, Smith RC, et al. Transcriptome signature of resistance exercise adaptations: Mixed muscle and fiber type specific profiles in young and old adults. *J Appl Physiol.* 2012; 112: 1625–36. Available from: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00435.2011>.
 8. Lundberg TR, Fernandez-Gonzalo R, Gustafsson T, Tesch PA. Aerobic exercise does not compromise muscle hypertrophy response to short-term resistance training. *J Appl Physiol.* 2013; 114: 81–89. Available from: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01013.2012>.
 9. Liu D, Sartor MA, Nader GA, Gutmann L, Treutelaar MK, Pistilli EE, et al. Skeletal muscle gene expression in response to resistance exercise: Sex specific regulation. *BMC Genomics.* 2010; 11: 659. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-659>.
 10. Nascimento EBM, Hangelbroek RWJ, GHooiveld GJEJ, Hoeks J, Van Marken Lichtenbelt WD, Hesselink MHC, et al. Comparative transcriptome analysis of human skeletal muscle in response to cold acclimation and exercise training in human volunteers. *BMC Med Genomics.* 2020; 13: 1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12920-020-00784-z>.
 11. Stepto NK, Coffey VG, Carey AL, Ponnampalam AP, Canny BJ, Powell D, et al. Global gene expression in skeletal muscle from well-trained strength and endurance athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2009; 41: 546–65. Available from: <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31818c6be9>.
 12. Schoenfeld BJ, Grgic J, Ogborn D, Krieger JW. Strength and hypertrophy adaptations between low- vs. High-load resistance training: A systematic review and meta-analysis. *J Strength Cond Res.* 2017; 31: 3508–23. Available from: <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000002200>.
 13. Krieger JW. Single Vs. Multiple Sets of Resistance. *J Strength Cond Res.* 2010; 24: 1150–9. Available from: <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181d4d36>.
 14. Schoenfeld BJ, Ogborn D, Krieger JW. Effects of Resistance Training Frequency on Measures of Muscle Hypertrophy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sport Med.* 2016; 46: 1689–97. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40279-016-0543-8>.
 15. Catoire M, Mensink M, Boekschoten MV, Hangelbroek R, Müller M, Schrauwen P, et al. Pronounced Effects of Acute Endurance Exercise on Gene Expression in Resting and Exercising Human Skeletal Muscle. *PLoS One.* 2012; 7. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051066>.
 16. Schroder EA, Harfmann BD, Zhang X, Sriksuea R, England JH, Hodge BA, et al. Intrinsic muscle clock is necessary for musculoskeletal health. *J Physiol.* 2015; 593: 5387–404. Available from: <https://doi.org/10.1113/JP271436>.
 17. Shanely AR, Zwetsloot KA, Travis Triplett N, Meaney MP, Farris GE, Nieman DC. Human skeletal muscle biopsy procedures using the modified Bergström technique. *J Vis Exp.* 2014; 1–8. Available from: <https://doi.org/10.3791/51812>.
 18. Makhnovskii PA, Gusev OA, Bokov RO, Gazizova GR, Vepkhvadze TF, Lysenko EA, et al. Alternative transcription start sites contribute to acute-stress-induced transcriptome response in human skeletal muscle. *Hum Genomics.* 2022; 16: 1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40246-022-00399-8>.
 19. Campos GER, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF et al. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: Specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol.* 2002; 88: 50–60. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00421-002-0681-6>.
 20. Yapici H, Güllü M, Yagin FH, Ugurlu D, Comertpay E, Eroglu O et al. The effect of 8-weeks of combined resistance training and chocolate milk consumption on maximal strength, muscle thickness, peak power and lean mass, untrained, university-aged males. *Front Physiol.* 2023; 14: 1–11. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1148494>.
 21. Deane CS, Willis CRG, Phillips BE, Atherton PJ, Harries LW, Ames RM, et al. Transcriptomic meta-analysis of disuse muscle atrophy vs. resistance exercise-induced hypertrophy in young and older humans. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2021; 12: 629–45. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12706>.
 22. Pillon NJ, Gabriel BM, Dollet L, Smith JAB, Sardón Puig L, Botella J, et al. Transcriptomic profiling of skeletal muscle adaptations to exercise and inactivity. *Nat Commun.* 2020; 11: 470. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13869-w>.
 23. Chapman MA, Arif M, Emanuelsson EB, Reitzner SM, Lindholm ME, Mardinoglu A, et al. Skeletal Muscle Transcriptomic Comparison between Long-Term Trained and Untrained Men and Women. *Cell Rep.* 2020; 31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107808>.
 24. Dzik KP, Grzywacz T, Łuszczczyk M, Kujach S, Flis DJ, Kaczor JJ. Single bout of exercise triggers the increase of vitamin D blood concentration in adolescent trained boys: a pilot study. *Sci Rep.* 2022; 12: 1–10. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05783-x>.
 25. Rundqvist HC, Montelius A, Osterlund T, Norman B, Esbjörnsson M, Jansson E. Acute sprint exercise transcriptome in human skeletal muscle. *PLoS One.* 2019; 14: 1–24. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223024>.
 26. Makhnovskii PA, Bokov RO, Kolpakov FA, Popov DV. Transcriptomic signatures and upstream regulation in human skeletal muscle adapted to disuse and aerobic exercise. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 1–20. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22031208>.
 27. Birdsey GM, Shah AV, Dufton N, Reynolds LE, Almagro LO, Yang Y et al. The endothelial transcription factor erg promotes vascular stability and growth through Wnt/β-catenin signaling. *Dev Cell.* 2015; 32: 82–96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.016>.
 28. Sakuma K, Yamaguchi A. The functional role of calcineurin in hypertrophy, regeneration, and disorders of skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010. Available from: <https://doi.org/10.1155/2010/721219>.
 29. Hudson MB, Price SR. Calcineurin: A poorly understood regulator of muscle mass. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45: 2173–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.029>.
 30. Dunn SE, Burns JL, Michel RN. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem.* 1999; 274: 21908–12. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21908>.
 31. Ehlers ML, Celona B, Black BL. NFATc1 controls skeletal muscle fiber type and is a negative regulator of MyoD activity. *Cell Rep.* 2014; 8: 1639–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.035>.
 32. Darby IA, Bisucci T, Raghoenath S, Olsson J, Muscat GEO, Koopman P. Sox18 is transiently expressed during angiogenesis in granulation tissue of skin wounds with an identical expression pattern to Flk-1 mRNA. *Lab Invest.* 2001; 81: 937–43. Available from: <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780304>.
 33. Neyroud D, Nosacka RL, Callaway CS, Trevino JG, Hu H, Judge SM, et al. FoxP1 is a transcriptional repressor associated with cancer cachexia that induces skeletal muscle wasting and weakness. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2021; 12: 421–42. Available from:

<https://doi.org/10.1002/jcsm.12666>.

34. Wright WE, Li C, Zheng C, Tucker HO. FOXP1 Interacts with MyoD to Repress its Transcription and Myoblast Conversion. *J Cell Signal*. 2021; 2: 9–26.
 35. Kurosaka M, Ogura Y, Sato S, Kohda K, Funabashi T. Transcription factor signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) is an inhibitory factor for adult myogenesis. *Skelet Muscle*. 2021; 11: 1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13395-021-00271-8>.
 36. Yamaki T, Wu CL, Gustin M, Lim J, Jackman RW, Kandarian SC. Rel A/p65 is required for cytokine-induced myotube atrophy. *Am J Physiol. Cell Physiol*. 2012; 303: 135–43. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00111.2012>.
 37. Arensdorf AM, Diedrichs D, Rutkowski DT. Regulation of the transcriptome by ER stress: Non-canonical mechanisms and physiological consequences. *Front Genet*. 2013; 4: 1–16. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00256>.
 38. Marafon BB, Pinto AP, Ropelle ER, de Moura LP, Cintra DE, Pauli JR, et al. Muscle endoplasmic reticulum stress in exercise. *Acta Physiol*. 2022; 235: e13799. Available from: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/apha.13799>.
 39. Møller AB, Vendelbo MH, Schjerling P, Couppez C, Møller N, Kjær M et al. Immobilization decreases foxo3a phosphorylation and increases autophagy-related gene and protein expression in human skeletal muscle. *Front Physiol*. 2019; 10: 1–14. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00736>.
 40. Senf SM, Dodd SL, Judge AR. FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70. *Am J Physiol. Cell Physiol*. 2010; 298. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2009>.
 41. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 2004; 117: 399–412. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00400-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00400-3).
- ## References
1. Vinogradova OL, Popov DV, Netreba AI, Cvirkun DV, Kurochkina NS, Bachinin AV, i dr. Optimizaciya processa fizicheskoy trenirovki: razrabotka novykh "shhadyashhih" podxodov k trenirovke silovykh vozmozhnostey, Fiziologiya cheloveka. 2013; 39: 71–85. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.7868/S0131164613050172>. Russian.
 2. Solsona R, Pavlin L, Bernardi H, Sanchez AMJ. Molecular regulation of skeletal muscle growth and organelle biosynthesis: Practical recommendations for exercise training. *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 1–31. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22052741>.
 3. Mesquita PHC, Vann CG, Phillips SM, McKendry J, Young KC, Kavazis AN, et al. Skeletal muscle ribosome and mitochondrial biogenesis in response to different exercise training modalities. *Front Physiol*. 2021; 12. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.725866>.
 4. Gordon PM, Liu D, Sartor MA, IglayReger HB, Pistilli EE, Gutmann L, et al. Resistance exercise training influences skeletal muscle immune activation: a microarray analysis. *J Appl Physiol*. 2012; 112: 443–53. Available from: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00860.2011>.
 5. Dickinson JM, D'Lugos AC, Naymik MA, Siniard AL, Wolfe AJ, Curtis DP, et al. Transcriptome response of human skeletal muscle to divergent exercise stimuli. *J Appl Physiol*. 2018; 124: 1529–40. Available from: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00014.2018>.
 6. Damas F, Ugrinowitsch C, Libardi CA, Jannig PR, Hector AJ, McGlory C, et al. Resistance training in young men induces muscle transcriptome-wide changes associated with muscle structure and metabolism refining the response to exercise-induced stress. *Eur J Appl Physiol*. 2018; 118: 2607–16. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00421-018-3984-y>.
 7. Raue U, Trappe TA, Estrem ST, Qian HR, Helvering LM, Smith RC, et al. Transcriptome signature of resistance exercise adaptations: Mixed muscle and fiber type specific profiles in young and old adults. *J Appl Physiol*. 2012; 112: 1625–36. Available from: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00435.2011>.
 8. Lundberg TR, Fernandez-Gonzalo R, Gustafsson T, Tesch PA. Aerobic exercise does not compromise muscle hypertrophy response to short-term resistance training. *J Appl Physiol*. 2013; 114: 81–89. Available from: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01013.2012>.
 9. Liu D, Sartor MA, Nader GA, Gutmann L, Treutelaar MK, Pistilli EE, et al. Skeletal muscle gene expression in response to resistance exercise: Sex specific regulation. *BMC Genomics*. 2010; 11: 659. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-659>.
 10. Nascimento EBM, Hangelbroek RWJ, GHooiveld GJEJ, Hoeks J, Van Marken Lichtenbelt WD, Hesselink MHC, et al. Comparative transcriptome analysis of human skeletal muscle in response to cold acclimation and exercise training in human volunteers. *BMC Med Genomics*. 2020; 13: 1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12920-020-00784-z>.
 11. Stepto NK, Coffey VG, Carey AL, Ponnampalam AP, Canny BJ, Powell D, et al. Global gene expression in skeletal muscle from well-trained strength and endurance athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2009; 41: 546–65. Available from: <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31818c6be9>.
 12. Schoenfeld BJ, Grgic J, Ogborn D, Krieger JW. Strength and hypertrophy adaptations between low- vs. High-load resistance training: A systematic review and meta-analysis. *J Strength Cond Res*. 2017; 31: 3508–23. Available from: <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000002200>.
 13. Krieger JW. Single Vs. Multiple Sets of Resistance. *J Strength Cond Res*. 2010; 24: 1150–9. Available from: <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181d4d36>.
 14. Schoenfeld BJ, Ogborn D, Krieger JW. Effects of Resistance Training Frequency on Measures of Muscle Hypertrophy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sport Med*. 2016; 46: 1689–97. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40279-016-0543-8>.
 15. Catoire M, Mensink M, Boekschooten MV, Hangelbroek R, Müller M, Schrauwen P, et al. Pronounced Effects of Acute Endurance Exercise on Gene Expression in Resting and Exercising Human Skeletal Muscle. *PLoS One*. 2012; 7. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051066>.
 16. Schroder EA, Harfmann BD, Zhang X, Srikuea R, England JH, Hodge BA, et al. Intrinsic muscle clock is necessary for musculoskeletal health. *J Physiol*. 2015; 593: 5387–404. Available from: <https://doi.org/10.1113/JP271436>.
 17. Shanely AR, Zwetsloot KA, Travis Triplett N, Meaney MP, Farris GE, Nieman DC. Human skeletal muscle biopsy procedures using the modified Bergström technique. *J Vis Exp*. 2014; 1–8. Available from: <https://doi.org/10.3791/51812>.
 18. Makhnovskii PA, Gusev OA, Bokov RO, Gazizova GR, Vepkhvadze TF, Lysenko EA, et al. Alternative transcription start sites contribute to acute-stress-induced transcriptome response in human skeletal muscle. *Hum Genomics*. 2022; 16: 1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40246-022-00399-8>.
 19. Campos GER, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF et al. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: Specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol*. 2002; 88: 50–60. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00421-002-0681-6>.
 20. Yapiçi H, Gülü M, Yagin FH, Ugurlu D, Comerpay E, Eroglu O et al. The effect of 8-weeks of combined resistance training and chocolate milk consumption on maximal strength, muscle thickness, peak power and lean mass, untrained, university-aged males. *Front Physiol*. 2023; 14: 1–11. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1148494>.
 21. Deane CS, Willis CRG, Phillips BE, Atherton PJ, Harries LW, Ames RM, et al. Transcriptomic meta-analysis of disuse muscle atrophy vs. resistance exercise-induced hypertrophy in young and older humans. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2021; 12: 629–45.

- Available from: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12706>.
22. Pillon NJ, Gabriel BM, Dollet L, Smith JAB, Sardón Puig L, Botella J, et al. Transcriptomic profiling of skeletal muscle adaptations to exercise and inactivity. *Nat Commun.* 2020; 11: 470. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13869-w>.
 23. Chapman MA, Arif M, Emanuelsson EB, Reitzner SM, Lindholm ME, Mardinoglu A, et al. Skeletal Muscle Transcriptomic Comparison between Long-Term Trained and Untrained Men and Women. *Cell Rep.* 2020; 31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107808>.
 24. Dzik KP, Grzywacz T, Łuszczzyk M, Kujach S, Flis DJ, Kaczor JJ. Single bout of exercise triggers the increase of vitamin D blood concentration in adolescent trained boys: a pilot study. *Sci Rep.* 2022; 12: 1–10. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05783-x>.
 25. Rundqvist HC, Montelius A, Osterlund T, Norman B, Esbjornsson M, Jansson E. Acute sprint exercise transcriptome in human skeletal muscle. *PLoS One.* 2019; 14: 1–24. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223024>.
 26. Makhnovskii PA, Bokov RO, Kolpakov FA, Popov DV. Transcriptomic signatures and upstream regulation in human skeletal muscle adapted to disuse and aerobic exercise. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 1–20. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22031208>.
 27. Birdsey GM, Shah AV, Dufton N, Reynolds LE, Almagro LO, Yang Y et al. The endothelial transcription factor erg promotes vascular stability and growth through Wnt/ β -catenin signaling. *Dev Cell.* 2015; 32: 82–96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.016>.
 28. Sakuma K, Yamaguchi A. The functional role of calcineurin in hypertrophy, regeneration, and disorders of skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010. Available from: <https://doi.org/10.1155/2010/721219>.
 29. Hudson MB, Price SR. Calcineurin: A poorly understood regulator of muscle mass. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45: 2173–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.029>.
 30. Dunn SE, Burns JL, Michel RN. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem.* 1999; 274: 21908–12. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21908>.
 31. Ehlers ML, Celona B, Black BL. NFATc1 controls skeletal muscle fiber type and is a negative regulator of MyoD activity. *Cell Rep.* 2014; 8: 1639–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.035>.
 32. Darby IA, Bisucci T, Raghoenath S, Olsson J, Muscat GEO, Koopman P. Sox18 is transiently expressed during angiogenesis in granulation tissue of skin wounds with an identical expression pattern to Flk-1 mRNA. *Lab Invest.* 2001; 81: 937–43. Available from: <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780304>.
 33. Neyroud D, Nosacka RL, Callaway CS, Trevino JG, Hu H, Judge SM, et al. FoxP1 is a transcriptional repressor associated with cancer cachexia that induces skeletal muscle wasting and weakness. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2021; 12: 421–42. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12666>.
 34. Wright WE, Li C, Zheng C, Tucker HO. FOXP1 Interacts with MyoD to Repress its Transcription and Myoblast Conversion. *J Cell Signal.* 2021; 2: 9–26.
 35. Kurosaka M, Ogura Y, Sato S, Kohda K, Funabashi T. Transcription factor signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) is an inhibitory factor for adult myogenesis. *Skelet Muscle.* 2021; 11: 1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13395-021-00271-8>.
 36. Yamaki T, Wu CL, Gustin M, Lim J, Jackman RW, Kandarian SC. Rel A/p65 is required for cytokine-induced myotube atrophy. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 2012; 303: 135–43. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00111.2012>.
 37. Arensdorf AM, Diedrichs D, Rutkowski DT. Regulation of the transcriptome by ER stress: Non-canonical mechanisms and physiological consequences. *Front Genet.* 2013; 4: 1–16. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00256>.
 38. Marafon BB, Pinto AP, Ropelle ER, de Moura LP, Cintra DE, Pauli JR, et al. Muscle endoplasmic reticulum stress in exercise. *Acta Physiol.* 2022; 235: e13799. Available from: <https://doi.org/10.1111/apha.13799>.
 39. Møller AB, Vendelbo MH, Schjerling P, Couppé C, Møller N, Kjær M et al. Immobilization decreases foxo3a phosphorylation and increases autophagy-related gene and protein expression in human skeletal muscle. *Front Physiol.* 2019; 10: 1–14. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00736>.
 40. Senf SM, Dodd SL, Judge AR. FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 2010; 298. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2009>.
 41. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004; 117: 399–412. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00400-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00400-3).