Дата публикации: 06.05.2024
DOI: 10.24412/2588-0500-2024_08_S1_2
УДК 612.17

Publication date: 06.05.2024
DOI: 10.24412/2588-0500-2024_08_S1_2
UDC 612.17

АНАЛИЗ МАРКЕРОВ НЕКРОЗА И СПЕЦИФИЧЕСКИХ АУТОАНТИТЕЛ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ПРИ СТРЕССОВОМ ПЕРЕНАПРЯЖЕНИИ МИОКАРДА: СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Н.Г. Беляев[1], Э.Д. Лёвочкина[2], С.И. Кубанов[1], А.Г. Сирак[3], Х.Р. Караева[4]

[1]Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь, Россия

[2]Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер, г. Ставрополь, Россия

[3]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ставрополь, Россия

[4]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Кавказская государственная академия», г. Черкесск, Россия

Аннотация. На взрослых крысах-самцах исследовались динамика аутоантител к сердечному тропонину I, к альфа-актину 1 сердечной мышцы, к тяжелой цепи бета-миозина 7В сердечной мышцы и активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, креатинфосфокиназы на разных этапах моделирования хронического физического перенапряжения. Установлено, что повышение уровня аутоантител происходило на 15-20 дни эксперимента, когда у животных был высокий уровень работоспособности. Повышение аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и креатинфосфокиназы зафиксировано на 35 день, когда уже имелись признаки развившегося хронического физического перенапряжения и регистрировались прогрессирующие патоморфологические изменения в миокарде. Результаты демонстрируют высокую релевантность аутоантител повреждениям миокарда на ранней стадии и более высокую чувствительность в сравнении с аланинаминотрансферазой, аспартатаминотрансферазой, креатинфосфокиназой.

Ключевые слова: физическая нагрузка, лабораторный анализ, аутоантитела, кардиомиоциты, маркеры ишемии.

ANALYSIS OF NECROSIS MARKERS AND SPECIFIC AUTOANTIBODIES IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF MYOCARDIAL STRESS OVERLOAD: COMPARATIVE ANALYSIS

N.G. Belyaev[1], E.D. Lyovochkina[2], S.I. Kubanov[1], A.G. Sirak[3], Kh.R. Karaeva[4]

[1]North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

[2]Stavropol Regional Clinical Oncology Center, Stavropol, Russia

[3]Stavropol State Medical University, Stavropol, Russia

[4]North-Caucasus State Academy, Cherkessk, Russia

Abstract. The dynamics of autoantibodies to cardiac troponin I, cardiac muscle actin alpha 1, myosin heavy chain 7B, cardiac muscle beta and activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatine phosphokinase at different stages of chronic physical overstrain modelling were studied in adult male rats. It was found that the increase in the level of autoantibodies occurred on days 15-20 of the experiment, when the animals had a high level of performance. The increase of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and creatine phosphokinase was recorded on day 35, when there were already signs of developed chronic physical overstrain and progressive pathomorphological changes in myocardium were registered. The results demonstrate high relevance of autoantibodies to myocardial damage at an early stage and higher sensitivity in comparison with alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatine phosphokinase.

Keywords: physical activity, laboratory analysis, autoantibodies, cardiomyocytes, ischemia markers.

Введение. Стремление к достижению высоких результатов, острота соревновательной борьбы – одни из факторов, вынуждающих спортсмена постоянно увеличивать объем и интенсивность тренировочных нагрузок. В подобных условиях высок риск нарушения адаптивных механизмов и развития дезадаптации и, как результат, возникновения патологических процессов в системах организма. Нарушения могут возникнуть в любой системе, испытывающей нагрузки в процессе тренировочной и соревновательной деятельности. Но наиболее серьезной формой срыва адаптационных реакций являются нарушения в сердечно-сосудистой системе, которые могут оказаться причиной смерти спортсмена. Приходится констатировать, что частота внезапной смерти спортсменов из года в год увеличивается [1-2].

В связи с этим актуален поиск методов, позволяющих выявить начинающиеся патологические процессы в кардиомиоцитах на самом раннем этапе. Такие методы диагностики, как ЭКГ, ЭхоКГ в большинстве своем не отражают начинающиеся и незначительные патологические изменения в ткани. Лабораторные методы по определению концентрации клеточных ферментов – аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и креатинфосфокиназы (КФК) могут свидетельствовать не только о повреждении ткани миокарда, но и об изменениях метаболизма печени, скелетных мышц и других органов. В этом плане перспективным может оказаться метод определения аутоантител (ауто-АТ) к белкам кардиомиоцитов [3-5]. При высокой тканевой специфичности изменение их концентрации происходит в соответствии с характером развития патологии ткани, что может иметь диагностическое и диагностико-дифференциальное значение [6-7].

С учетом вышесказанного, целью работы являлось сравнение динамики содержания ауто-АТ к сердечному тропонину I (cTnI), к альфа-актину 1 сердечной мышцы (ACTC1), к тяжелой цепи бета-миозина 7B (MYH7B) с активностью клеточных ферментов АЛТ, АСТ, КФК на разных этапах моделирования хронического физического перенапряжения (ХФП) с целью установления их диагностической ценности для определения ранних признаков формируемых нарушений в миокарде.

Методы и организация исследования. Экспериментальным материалом в наших исследованиях служили лабораторные животные – крысы-самцы в возрасте 4 месяцев. Животные были разделены на 2 группы – контрольную (60 животных) и экспериментальную (140 животных). Животные контрольной группы содержались в обычных условиях вивария и служили группой сравнения. На животных экспериментальной группы после предварительной девятинедельной тренировки моделировалось состояние ХФП путем принуждения их к выполнению постоянно растущей по продолжительности и интенсивности физической нагрузки. Как при тренировке животных, так и при моделировании ХФП использовался тредмил – беговая дорожка.

В крови животных осуществлялось количественное определение ауто-АТ к cTnI, ACTC1 и к MYH7B методом твердофазного иммуноферментного анализа на полуавтоматическом фотометре Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Финляндия) с использованием реактивов Cloud CloneCorp (Китай).

Уровни активности ферментов АЛТ, АСТ и концентрации КФК в сыворотке крови исследовали с помощью метода фотоэлектронного умножителя на автоматическом иммунохимическом анализаторе Mindray CL-2000i (MedRaySys, КНР).

Для получения информации о возможных структурных изменениях в кардиомиоцитах животных в процессе выполнения интенсивных и продолжительных мышечных нагрузок осуществлялись гистологические исследования. С этой целью после декапитации животных сердце извлекалось, взвешивалось и затем фиксировалось в 10% забуферном растворе формалина в течение 72 часов с последующим промыванием водопроводной

водой в течение 24 часов, обезвоживанием в изопропиловом спирте и заключением в медицинский парафин Histomix (Biovitrum, Россия). Гистологические срезы толщиной 3-4 мкм были получены с использованием ротационного микротома HM 325 (Termo, Германия). Готовые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Оценку микропрепаратов проводили с использованием лабораторного микроскопа Axio Imager 2 (A2), оснащенного системой визуализации изображений AxioCam MRc5 и программным обеспечением Zen 2012 Pro (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Германия). Биологический материал для постановки лабораторного анализа получен в соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008. Для получения сыворотки использовали пробирки с разделительным гелем или активатором свертывания (кремнеземом), который создавал барьер между сывороткой и свернувшейся кровью после центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 минут. Работа с биологическим материалом проводилась в соответствии с требованиями и нормативными документами Министерства здравоохранения; СанПин 2.1.3.2630-10; СП 1.3.2322-08; СП 2.1.5.2826-10; СанПин 2.1.7.728-99; ГОСТ 526 23.4-2015.

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали с помощью методов вариационной статистики с использованием статистического пакета Biostat (версия 4.03). Нормальность распределения определялась с помощью критерия Шапиро-Уилка, сравнение данных проводилось по t-критерию Стьюдента. Полученные результаты фиксировали в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего арифметического (M±m). О достоверности различий величин исследуемых показателей судили при $p<0,05$.

Проведение исследований было одобрено независимой комиссией по биоэтике Северо-Кавказского федерального университета (протокол № 002 от 22.04.24).

Результаты исследования и их обсуждение. В процессе эксперимента нагрузка на животных в течение первых 20 дней возрастала, достигая максимальных величин на 20-25 дни моделируемого ХФП с последующим снижением к 35 дню эксперимента более чем в три раза. Незначительное снижение количества эритроцитов и гематокрита на 20 день моделирования ХФП можно расценивать как одну из форм положительных адаптивных реакций на продолжительные мышечные нагрузки. В данном случае улучшаются реологические свойства крови и уменьшается нагрузка на сердце. Последующий период эксперимента с 25 по 35 день характеризовался развитием анемии, о чем свидетельствует снижение количества эритроцитов, уровня гемоглобина, что говорит о наступившем ХФП. Подтверждением ХФП служат данные гистологических исследований. У животных, прошедших предварительную тренировку, на момент начала моделирования ХФП регистрировалась умеренная гипертрофия миокарда (рис. 1) при отсутствии в кардиомиоцитах патологических изменений. Гипертрофия миокарда явилась следствием капилляризации и кровенаполнения сосудов, а не утолщения миоцитов (рациональный тип адаптивных изменений в сердце) [8].

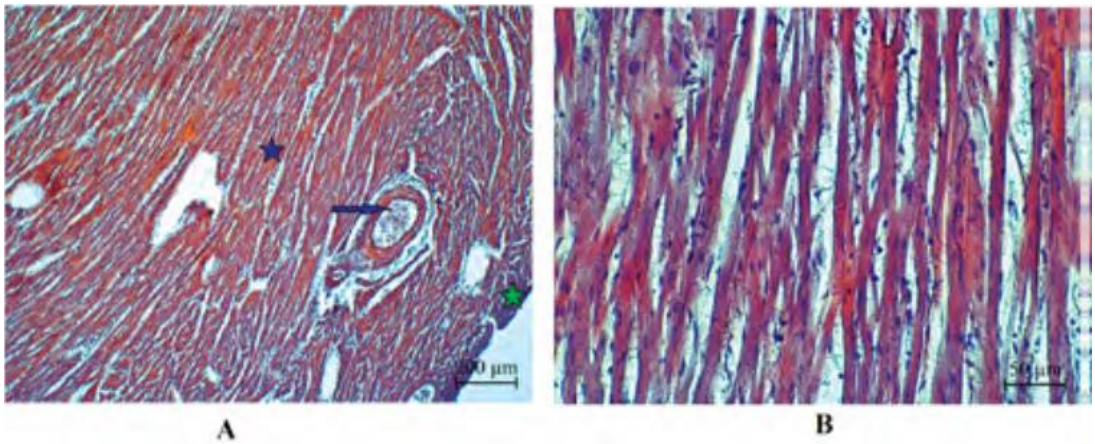


Рис. 1. Поперечный срез сердца тренированной крысы на момент начала моделирования хронического физического перенапряжения (А) окраска гематоксилином и эозином с увеличением в 50 раз. В – миокард (кардиомиоциты), окраска гематоксилином и эозином с увеличением в 200 раз

Примечание: зеленая звездочка обозначает эпикард, синяя звездочка указывает на миокард, синяя стрелка отмечает артериолу

В то же время, на 30-35 дни моделирования ХФП на гистологических срезах сердца регистрируются прогрессирующие патоморфологические изменения в миокарде, фиксируются признаки дистрофии с нарушением нормальной организации клеток, выделяются небольшие группы кардиомиоцитов с чередованием слабо выраженной гипертрофии (очаговая) и атрофии (очаговая) (рис. 2).

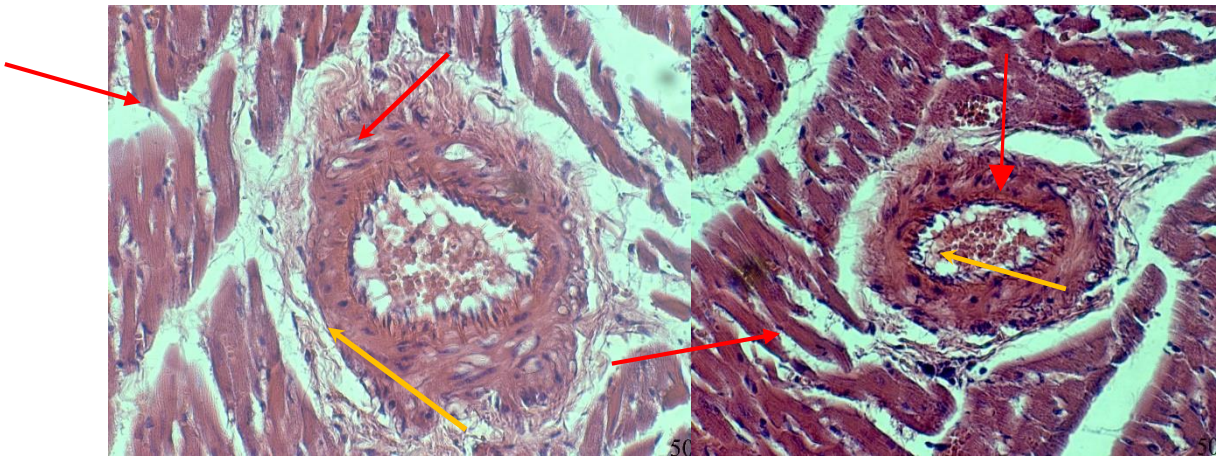


Рис. 2 Гистологическая картина миокарда при моделировании хронического физического перенапряжения экспериментальной группы (30-35 день)

Примечание: фрагмент миокарда (А, В) представлен с признаками кардиолизиса, гипертрофии, дистрофии и отечности сосуда миокарда. По центру данного фрагмента кровеносный сосуд с утолщённой стенкой, нарушением ее структуры и со стазом крови. Увеличение объема пространства между клетками сосудистой стенки, сопровождающееся раздутием клеток. Окраска – гематоксилин-эозин

Аутоиммунная реакция организма животных на мышечные нагрузки в виде повышения концентрации ауто-АТ к cTnI и ACTC1 отмечена уже на 10 день моделирования ХФП (рис. 3). При этом достоверно значимое повышение ауто-АТ к MYH7B отмечено на 15 день эксперимента.

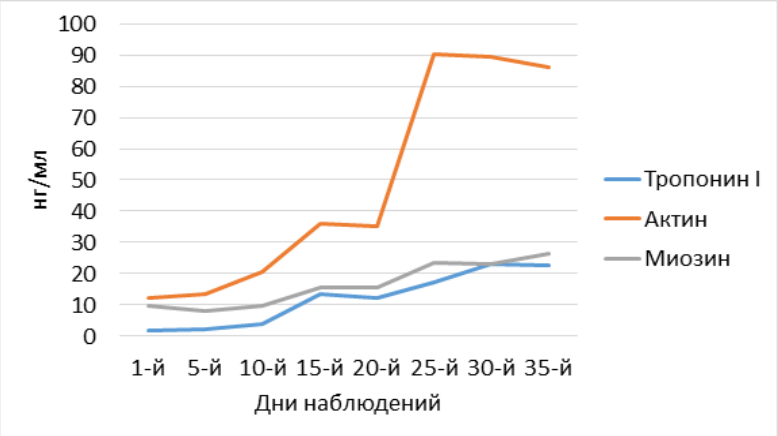


Рис. 3. Динамика аутоантител к сердечному тропонину I, к белкам сердечной мышцы альфа-актину 1 и тяжелой цепи бета-миозина 7B в процессе моделирования хронического физического перенапряжения

Уровень определяемых ауто-АТ оставался высоким все последующие этапы наблюдений с незначительными колебаниями. В то же время, сохранение количества определяемых ауто-АТ на высоком уровне свидетельствует об истощении функциональных резервов организма и возможном прогрессировании патоморфологических изменений в миокарде. Считается, что только быстрое возвращение концентрации сывороточных кардиоспецифических белков к исходному уровню может свидетельствовать о высокой регенерации миоцитов [9].

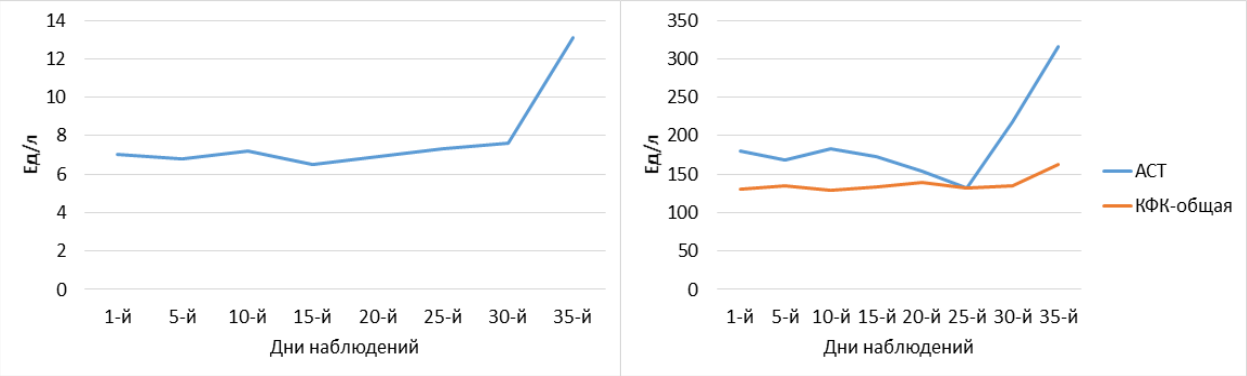


Рис. 4. Динамика аланинаминотрансферазы (АМТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и креатинфосфокиназы (КФК) в процессе моделирования хронического физического перенапряжения

В период моделирования ХФП активность определяемых клеточных ферментов АЛТ, АСТ, КФК оставалась стабильной в течение 30 дней наблюдений, достоверно значимое повышение отмечено только на 35 день наблюдений. Так, уровень АЛТ возрос почти в 2 раза, а содержание АСТ – более чем на 75% в сравнении с активностью фермента на начало моделирования ХФП. Колебания уровня КФК первые 30 дней не были достоверно значимыми и только к 35

дню достоверно превысили величины, определяемые на начало эксперимента.

Заключение. Из представленных данных следует, что активность клеточных ферментов АЛТ, АСТ, КФК в условиях моделирования ХФП выросла тогда, когда уже проявились патологические изменения в кардиомиоцитах, и когда ряд показателей (снижение массы тела, падение работоспособности, анемия) подтверждали развившееся ХФП. В отличие от этого, аутоАТ к cTnI и АСТС1 гораздо раньше анонсируют патоморфологические изменения в миокарде, и при установлении референсных значений могут быть рекомендованы в качестве диагностического теста функционального состояния сердечной мышцы в период адаптации к интенсивным физическим нагрузкам.

Источник финансирования. Работа выполнялась при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (№ 14876ГУ/2019).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Funding. The research was carried out with the financial support of the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in Science and Technology (№ 14876GU/2019).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Внезапная сердечная смерть в спорте: факторы риска, нозологическая характеристика, направления профилактики / Л. С. Ходасевич, С. Н. Чупрова, А. А. Абакумов, А. Ф. Хечумян // Спортивная медицина. Наука и практика. – 2016. – Т. 6. – № 3. – С. 76-84. DOI: 10.17238/-ISSN2223-2524.2016.3.76
2. Webster, G. Screening to prevent sudden death among young people: what's new? / G. Webster, T. Carberry, S. Berger // Curr Opin Cardiol. – 2020. – Vol. 35. – № 1. – P. 80-86. DOI: 10.1097/HCO.-0000000000000689.
3. Динамика аутоантител к белкам кардиомиоцитов на разных этапах моделируемых мышечных нагрузок / Беляев Н. Г., Левочкина Е. Д., Батурин В. А. [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2022. – Т. 26. – № 1. – С. 51-61.
4. Высокочувствительный тропонин – новая эра в диагностике повреждений сердца у спортсменов / В. В. Дорофейков, М. С. Смирнов, И. В. Зырянова, Ю. Ф. Кашкаров // Мир спорта. – 2019. – № 2. – С. 20-23.
5. Прогностическое значение аутоантител к белкам кардиомиоцитов в диагностике хронического физического перенапряжения / Левочкина Е. Д., Беляев Н. Г., Батурин В. А. [и др.] // Вестник РУДН. – 2022. – Т. 3. – № 26. – С. 289-303.
6. Мамцева, Г. И. Диагностическая ценность определения уровня антимиозиновых антител при кардиомиопатиях / Г. И. Мамцева, В. А. Батурин, З. В. Нерсесянц // Российский аллергологический журнал. – 2012. – № 1. – С. 195-196.
7. Сравнительное изучение информативности неинвазивных методов диагностики воспалительных заболеваний миокарда / Титов В. А., Игнатьева Е. С., Митрофанова Л. Б. [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2018. – № 2. – С. 53-59.
8. Особенности физиологического ремоделирования «спортивного сердца» / Смоленский А. В., Михайлова А. В., Борисова Ю. А. [и др.] // Сборник Матер. Всероссийской (с международным участием) научно-практической конференции «Спортивная медицина. Здоровье и физическая культура. Сочи 2012», г. Сочи, 20-23 июля 2012 г. – Волгоградский государственный университет, 2012. – 758 с.
9. Cardiac troponin T alterations in myocardium and serum of rats after stressful, prolonged intense exercise / Chen Y., Serfass R. C., Mackey-Bojack S. M. [et al] // Journal of Applied Physiology. – 2000. – Vol. 88. – № 5. – P. 1749-1755. DOI: 10.1152/jappl.2000.88.5.1749.

REFERENCES

1. Khodasevich L.S., Chuprova S.N., Abakumov A.A., Khechumyan A.F. Sudden cardiac death in sports: risk factors, nosological characteristics, prevention directions. *Sports medicine: research and practice*, 2016, vol. 6, no. 3, pp. 76-84. (in Russ.)

2. Webster G., Carberry T., Berger S. Screening to prevent sudden death among young people: what's new? *Curr Opin Cardiol*, 2020, vol. 35, no. 1, pp. 80-86.
3. Belyaev N.G. Lyovochkina E.D., Baturin V.A., Rzhepakovskij I.V., Abasova T.V., Piskov S.I. Auto-antibodies to cardiomyocyte proteins dynamics at different stages of simulated muscle loads. *Bulletin of RUDN Journal of Medicine*, 2022, vol. 26, no. 1, pp. 51-61. (in Russ.)
4. Dorofejkov V.V., Smirnov M.S., Zyryanova I.V., Kashkarov Yu.F. High-sensitivity troponin: a new era in the diagnosis of heart damage in athletes (own experience and literature review). *Mir sporta*, 2019, no. 2, pp. 20-23. (in Russ.)
5. Lyovochkina E.D., Belyaev N.G., Baturin V.A., Rzhepakovskij I.V., Abasova T.V., Smyshnov K.M., Piskov S.I. Prognostic value of autoantibodies to cardiomyocyte proteins in the diagnosis of chronic physical overexertion. *RUDN Journal of Medicine*, 2022, vol. 3, no. 26, pp. 289-303. (in Russ.)
6. Mamtseva G.I., Baturin V.A., Nersesyants Z.V. Diagnostic value of identifying the level of anti-myosin antibodies in cardiomyopathy. *Russian Journal of Allergy*, 2012, no. 1, pp. 195-196. (in Russ.)
7. Titov V.A., Ignat'eva E.S., Mitrofanova L.B., Ryzhkova D.V., Zverev D.A., Lebedev D.S. Comparative study of significance of non-invasive diagnostic methods in inflammatory diseases of the heart. *Russian Journal of Cardiology*, 2018, no. 2, pp. 53-59. (in Russ.)
8. Smolenskij A.V., Mikhajlova A.V., Borisova Yu.A., Belotserkovskaya Z.B. Features of physiological remodeling of the "Athlete's heart". Materials of the All-Russian (with International Participation) Scientific and Practical Conference "Sports Medicine. Health and Physical Culture. Sochi 2012". Volgograd State University, 2012. 758 p. (in Russ.)
9. Chen Y. Serfass R.C., Mackey-Bojack S.M., Kelly K.L., Titus J.L., Apple F.S. Cardiac troponin T alterations in myocardium and serum of rats after stressful, prolonged intense exercise. *Journal of Applied Physiology*, 2000, vol. 88, no. 5, pp. 1749-1755.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:
Николай Георгиевич Беляев – профессор кафедры физиологии и патологии, Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, e-mail: belyaev-nikolay@mail.ru.
Эльвира Даутовна Левочкина – биолог патологоанатомического отделения «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер», Ставрополь, e-mail: minaevaelvira1990 @yandex.ru.
Сергей Исмаилович Кубанов – кандидат медицинских наук, доцент, и.о. заместителя декана по практической медицине медико-биологического факультета, Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, e-mail: sik007@yandex.ru.
Алла Григорьевна Сирак – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой гистологии, Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, e-mail: alla-sirak-75@yandex.ru.
Халимат Руслановна Караева – студентка 6 курса, Северо-Кавказская государственная академия, Черкесск, e-mail: doc.karaeva@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0009-0008-3633-7541.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:
Nikolaj G. Belyaev – Professor of the Department of Physiology and Pathology, North-Caucasus Federal University, Stavropol, e-mail: belyaev-nikolay@mail.ru.
El'vira D. Levochkina – Biologist of the Pathology Department, Stavropol Regional Clinical Oncology Center, Stavropol, e-mail: minaeva-elvira1990@yandex.ru.
Sergej I. Kubanov – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Acting Deputy Dean for Practical Medicine, Faculty of Biomedical Sciences, North-Caucasus Federal University, Stavropol, e-mail: sik007@yandex.ru.
Alla G. Sirak – Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Histology, Stavropol State Medical University, Stavropol, e-mail: alla-sirak-75@yandex.ru.
Khalimat R. Karaeva – 6th year Student, North-Caucasus State Academy, Cherkessk, e-mail: doc.karaeva@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0009-0008-3633-7541.

Для цитирования: Анализ маркеров некроза и специфических аутоантител в экспериментальной модели при стрессовом перенапряжении миокарда: сравнительная характеристика / Беляев Н. Г., Лёвочкина Э. Д., Кубанов С. И. [и др.] // Современные вопросы биомедицины. – 2024. – Т. 8. – № S1. DOI: 10.24412/2588-0500-2024_08_S1_2

For citation: Belyaev N.G., Lyovochkina E.D., Kubanov S.I., Sirak A.G., Karaeva Kh.R. Analysis of necrosis markers and specific autoantibodies in an experimental model of myocardial stress overload: comparative analysis. *Modern Issues of Biomedicine*, 2024, vol. 8, no. S1. DOI: 10.24412/2588-0500-2024_08_S1_2