

## Влияние стрессоустойчивости на экспрессию проаутофагического белка Beclin-1 в миокарде после экспериментального ушиба сердца

Е. И. Ключникова\*, О. В. Корпачева, С. И. Мозговой,  
А. Н. Золотов, А. В. Кононов

Омский государственный медицинский университет,  
Россия, 644099, г. Омск, ул. Ленина, д. 12

**Для цитирования:** Е. И. Ключникова, О. В. Корпачева, С. И. Мозговой, А. Н. Золотов, А. В. Кононов. Влияние стрессоустойчивости на экспрессию проаутофагического белка Beclin-1 в миокарде после экспериментального ушиба сердца. *Общая реаниматология*. 2023; 19 (6): 54–61. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2023-6-54-61> [На русск. и англ.]

\*Адрес для корреспонденции: Ключникова Евгения Игоревна, kei\_omsk@mail.ru

### Резюме

**Цель исследования.** Оценка выраженности экспрессии проаутофагического белка Beclin-1 в миокарде при различной стрессоустойчивости после экспериментального ушиба сердца.

**Материалы и методы.** В исследование включили 68 белых беспородных крыс-самцов массой 250–300 г. Животных ранжировали по крайним вариантам стрессоустойчивости. Среднестрессоустойчивых крыс ( $n=36$ ) исключили из исследования. Затем сформировали контрольную ( $n=16$ ) и опытную ( $n=16$ ) группы. В каждой группе выделили подгруппы, включавшие крыс с высокой и низкой стрессоустойчивостью, по 8 животных в каждой. В опытной группе через 24 ч после моделирования ушиба сердца из межжелудочковой перегородки, передних стенок левого и правого желудочков иссекали фрагменты миокарда 5×5 мм, изготавливали гистологические срезы, проводили реакцию с первичными поликлональными антителами Anti-Beclin-1. Полученные образцы исследовали под микроскопом.

**Результаты.** Иммуногистохимическое исследование выявило статистически значимое увеличение ( $p=0,0002$ ) экспрессии белка Beclin-1 в цитоплазме кардиомиоцитов в опытной группе по сравнению с контрольной вне зависимости от исходной стрессоустойчивости. Однако в миокарде высокоустойчивых к стрессу травмированных крыс наблюдали более выраженный уровень экспрессии белка Beclin-1 ( $Me=4,3$ ;  $LQ=4,0$ ;  $HQ=4,3$ ) в сравнении с низкоустойчивыми особями ( $Me=3,6$ ;  $LQ=3,3$ ;  $HQ=3,6$ ) ( $p=0,0009$ ).

**Заключение.** Выявленное увеличение экспрессии белка Beclin-1 в посттравматическом периоде экспериментального ушиба сердца свидетельствует об активации процессов аутофагии. Выраженность аутофагии различалась в зависимости от стрессоустойчивости организма животного.

**Ключевые слова:** ушиб сердца, аутофагия, Beclin-1, стрессоустойчивость

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Influence of Stress Resistance on Myocardial Expression of the Pro-Autophagic Protein Beclin-1 After Cardiac Contusion in Experimental Setting

Evgenia I. Klyuchnikova\*, Olga V. Korpacheva, Sergey I. Mozgovoy,  
Alexander N. Zolotov, Alexey V. Kononov

Omsk State Medical University, Ministry of Health of Russia,  
12 Lenin Str., 644099 Omsk, Russia

### Summary

**Objective.** Evaluation of myocardial expression of the pro-autophagic protein Beclin-1 after cardiac contusion in experimental animals with different stress resistance.

**Materials and methods.** The study included 68 white mongrel male rats weighing 250–300 g. After ranking for extreme variants of stress resistance, moderately stress-resistant rats ( $N=36$ ) were excluded from the study. The remaining animals were split into the control ( $N=16$ ) and study ( $N=16$ ) groups, each group composed of 8 high stress resistant and 8 low stress resistant rats. In the study group, 24 hours after inflicted cardiac contusion, 5×5 mm myocardial tissue specimens were sampled from the intraventricular septum, anterior walls of the left and right ventricles, histological sections were made, and a reaction with primary polyclonal Anti-Beclin-1 antibodies was performed. Beclin-1 expression was evaluated under the microscope.

**Results.** Immunohistochemical evaluation revealed a statistically significant increase in Beclin-1 protein expression ( $P=0.0002$ ) in the cytoplasm of cardiomyocytes in the study group vs the control group, regardless of animals' baseline stress resistance. However, expression of Beclin-1 protein in the myocardium of highly

stress-resistant rats ( $Me=4.3$ ;  $LQ=4.0$ ;  $HQ=4.3$ ) was significantly higher versus low-resistant animals ( $Me=3.6$ ;  $LQ=3.3$ ;  $HQ=3.6$ ) ( $P=0.0009$ ).

**Conclusion.** Increased expression of Beclin-1 protein in the post-traumatic period of experimental cardiac contusion indicates autophagic flux activation. Intensity of autophagy varied depending on the animal's stress resistance.

**Keywords:** cardiac contusion, autophagy, Beclin-1, stress resistance

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

Read the full-text English version at [www.reanimatology.com](http://www.reanimatology.com)

## Введение

Основными патогенетическими факторами посттравматического периода ушиба сердца являются циркуляторная гипоксия и нарушение течения энергозависимых процессов [1, 2] в совокупности с механическим повреждением, приводящие к накоплению в кардиомиоцитах поврежденных органелл, несвернутых белков, лактата, ионов  $Ca^{2+}$ , а также к нехватке субстрата для поддержания необходимого уровня гомеостаза и запуска репаративных процессов [3–5]. На моделях ишемического повреждения миокарда эти факторы описаны как триггеры, способные привести к увеличению активности феномена аутофагии — одного из вариантов запрограммированной клеточной гибели, суть которого заключается в деградации поврежденных органелл с целью дальнейшего использования их клеткой для восстановления метаболизма и формирования новых функционально полноценных структур [6]. Кроме того, в патогенезе тупой травмы сердца существенную роль играет стресс-реакция в рамках общего адаптационного синдрома. Выполненными ранее исследованиями нами были определены паттерны системных и тканевых гормонально-метаболических сдвигов в посттравматическом периоде экспериментального ушиба сердца, характерных для стресс-реакции, но различных по выраженности у животных с разным исходным уровнем устойчивости к стрессу [7]. В другом исследовании [8] была показана зависимость функций кроветворных органов от тонуса симпатoadренальной и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем у собак с разной стрессовой чувствительностью.

Исходя из этого предположили, что в посттравматическом периоде ушиба сердца существуют предпосылки для феномена аутофагии как тканевой стресс-ассоциированной реакции миокарда, выраженность которой может различаться в зависимости от уровня стрессоустойчивости организма.

Цель исследования — оценка выраженности экспрессии проаутофагического белка Beclin-1 в миокарде при различной стрессоустойчивости после экспериментального ушиба сердца.

## Материал и методы

В исследование включили 68 белых беспородных крыс-самцов массой 250–300 г в соответствии с пра-

вилами проведения работ и содержания животных (Приказ Минздрава РФ от 01.04.2016 №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики») при свободном доступе к комбинированному корму и воде. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России. В качестве средства для наркоза на всех инвазивных этапах эксперимента использовали препарат Золетил 100 (тилетамин, золазепам) в дозе 30 мг/кг внутривенно.

Для формирования контрольной (К) и опытной (О) групп провели оценку стрессоустойчивости животных посредством модифицированной методики ранжирования с использованием тестов «Открытое поле» и принудительного плавания Порсолта [9]. Результаты выполненных ранее исследований с оценкой в плазме крови концентрации кортикостерона, глюкозы, триглицеридов, лактата, а также содержания в миокарде восстановленного глутатиона и общей антиоксидантной способности показали, что модифицированная методика ранжирования крыс по стрессоустойчивости позволяет произвести отбор особей с максимально выраженными различиями системных и тканевых признаков стресс-реакции [7].

Среднестрессоустойчивых животных ( $n=36$ ) исключили из исследования, так как критерием отбора установили крайние варианты стрессоустойчивости.

В каждую из групп включили животных с низкой (Н) и высокой (В) стрессоустойчивостью. Таким образом сформировали две подгруппы контрольной группы (КВ и КН) и две подгруппы опытной группы (ОВ и ОН), по 8 животных в каждой.

В опытной группе моделировали ушиб сердца с помощью оригинального устройства, имитирующего удар передней поверхности грудной клетки о стойку руля при столкновении движущегося автомобиля с препятствием [10].

Сердца крыс извлекали через 24 ч после моделирования травмы, изготавливали срезы сердца. Для выявления зон повреждения срезы окрашивали раствором нитросинего тетразолия, после чего для повышения контрастности окраски срезы помещали в 10% раствор формалина на 30 мин [11]. Поврежденные участки миокарда имели серо-белый цвет, а неповрежденный миокард — сине-черный цвет (рис. 1). Фрагменты миокарда 5×5 мм иссекали из зон, подверженных наибольшему травматическому воздействию: межжелудочковой перегородки, передних стенок левого и правого желудочков. Образцы для микроскопии обрабатывали по общепринятой методике, заливали в парафин. Гистологические сре-

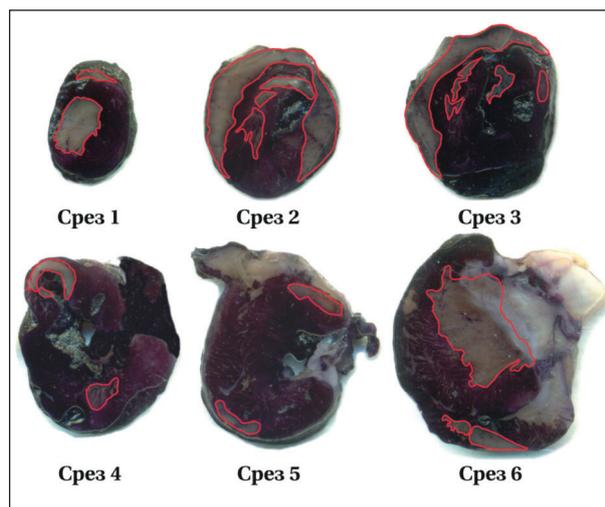
зы толщиной 5 мкм изготавливали на микротоме EpreDiaHM 340E (EpreDia, Великобритания) и наносили на стекла с адгезивным покрытием. Полученные образцы подвергали депарафинизации ксилолом и обрабатывали спиртами нисходящей концентрации.

Для оценки экспрессии проаутофагического белка Beclin-1 проводили реакцию с первичными поликлональными кроличьими антителами Anti-Becn-1 (HUABIO, Китай), номер R1509-1, разведение 1:100. Результаты иммуногистохимического исследования визуализировали с помощью набора реагентов «Универсальная двухстадийная система детекции PrimeVision: антитела к IgG мыши/кролика — HRP/DAB» (ПраймБиоМед, Россия). Препараты докрашивали гематоксилином. Иммуногистохимическую реакцию расценивали как положительную при появлении в цитоплазме кардиомиоцитов коричневого окрашивания. Световую микроскопию осуществляли на микроскопе Axioskop 40 (Zeiss, Германия) при 400-кратном увеличении в 10 полях зрения в каждом препарате. С помощью камеры AxioCam 503 color (Zeiss, Германия) и графической программы ZenBlue изображения каждого поля зрения фиксировали для дальнейшей оценки результатов иммуногистохимического исследования.

Анализ полученных изображений миокарда проводили с использованием полуколичественного метода. Система подсчета учитывала два параметра: интенсивность иммуногистохимической окраски по четырехбалльной шкале (0 — отсутствие окрашивания, 1 — слабая интенсивность окрашивания, 2 — умеренная интенсивность окрашивания, 3 — выраженное окрашивание) и площадь окрашивания, выраженную в баллах, соответствующих проценту окрашенных кардиомиоцитов от всех кардиомиоцитов в поле зрения (0–20% — 1 балл, 20–40% — 2 балла, 40–60% — 3 балла, 60–80% — 4 балла, 80–100% — 5 баллов). Конечным результатом являлась сумма баллов интенсивности окрашивания и площади окрашенных кардиомиоцитов для каждого отдельно взятого поля зрения, после чего производили расчет среднего арифметического значения для всех 10 полей зрения и рассчитывали индекс экспрессии для каждого животного, далее производили сравнение значений показателей, полученных у животных из разных групп и подгрупп.

Моделирование ушиба сердца и пробоподготовку проводили в лаборатории кафедры патофизиологии, иммуногистохимическое исследование — в лаборатории кафедры патологической анатомии Омского государственного медицинского университета.

Количественные переменные проверяли на нормальность распределения с использованием теста Шапиро–Уилка. Данные обработали статистически методами описательной статистики и сравнения выборок ( $U$ -критерий Манна–Уитни). Уровень статистической значимости приняли равным 0,05. Данные обработали с использованием программы IBM SPSS Statistics 23. Результаты представили в виде медианы ( $Me$ ) и межквартильного диапазона ( $LQ$ – $HQ$ ).



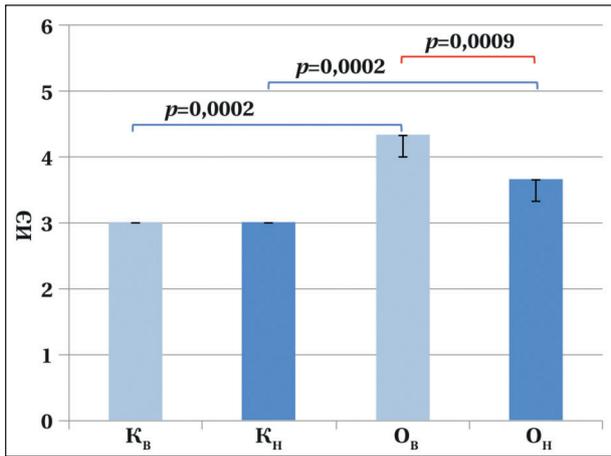
**Рис. 1. Макроскопическая визуализация очагов повреждения миокарда раствором нитросинего тетразолия.**  
**Примечание.** Очаги повреждения обведены красной линией.

## Результаты

Макроскопические изменения в миокарде после окраски раствором нитросинего тетразолия заключались в появлении окрашивания серо-белым цветом поврежденных участков и сине-черным цветом — неповрежденных. При микроскопическом исследовании в зоне повреждения миокарда после экспериментального ушиба сердца наблюдали отек и расширение пространств между кардиомиоцитами, нерегулярную структуру вставочных дисков, очаговую утрату поперечной исчерченности с появлением гиперэозинофильных участков, волнообразную деформацию кардиомиоцитов, а также — начало фрагментации отдельных кардиомиоцитов.

Иммуногистохимическое исследование выявило значительное увеличение ( $p=0,0002$ ) экспрессии проаутофагического белка Beclin-1 в цитоплазме кардиомиоцитов в опытной группе по сравнению с контрольной (рис. 2). В миокарде высокоустойчивых к стрессу травмированных крыс (подгруппа ОВ) наблюдали статистически значимо высокий уровень ( $p=0,0009$ ) экспрессии Beclin-1 ( $Me=4,3$ ;  $LQ=4,0$ ;  $HQ=4,3$ ) в сравнении с низкоустойчивыми травмированными животными из подгруппы ОН ( $Me=3,6$ ;  $LQ=3,3$ ;  $HQ=3,6$ ). Различий между подгруппами контрольной группы не выявили ( $Me=3,0$ ;  $LQ=3,0$ ;  $HQ=3,0$ ).

Качественная оценка экспрессии Beclin-1 показала, что в контрольной группе положительная реакция отсутствовала либо определялась в незначительном количестве в виде неравномерных вкраплений в цитоплазме кардиомиоцитов коричневого цвета низкой интенсивности. Различия между низко- и высокоустойчивыми к стрессу особями контрольной группы (подгруппы КВ и КН) отсутствовали (рис. 3, *a, b*).



**Рис. 2.** Экспрессия проаутофагического маркера Beclin-1 в цитоплазме кардиомиоцитов в зоне повреждения через 24 ч после моделирования ушиба сердца.

**Примечание.** ИЭ — индекс экспрессии в абсолютных единицах, представляет собой результат деления суммы баллов интенсивности окрашивания и баллов площади окрашивания на количество полей зрения; К<sub>В</sub> — контрольная группа, подгруппа с высокой стрессоустойчивостью; К<sub>Н</sub> — контрольная группа, подгруппа с низкой стрессоустойчивостью; О<sub>В</sub> — опытная группа, подгруппа с высокой стрессоустойчивостью; О<sub>Н</sub> — опытная группа, подгруппа с низкой стрессоустойчивостью.

У крыс с высокой стрессоустойчивостью после тупой травмы сердца регистрировали неравномерное цитоплазматическое окрашивание умеренной или высокой интенсивности диффузного характера (рис. 3, с). В подгруппе низкоустойчивых к стрессу травмированных крыс (О<sub>Н</sub>) отмечали отдельные фокусы кардиомиоцитов с цитоплазматическим окрашиванием умеренной или низкой интенсивности (рис. 3, d). У травмированных животных вне зависимости от устойчивости к стрессу (подгруппы О<sub>В</sub> и О<sub>Н</sub>) наблюдали тенденцию к увеличению интенсивности окраски и количества положительно окрашенных кардиомиоцитов по направлению к эпикарду, в зонах травматического повреждения.

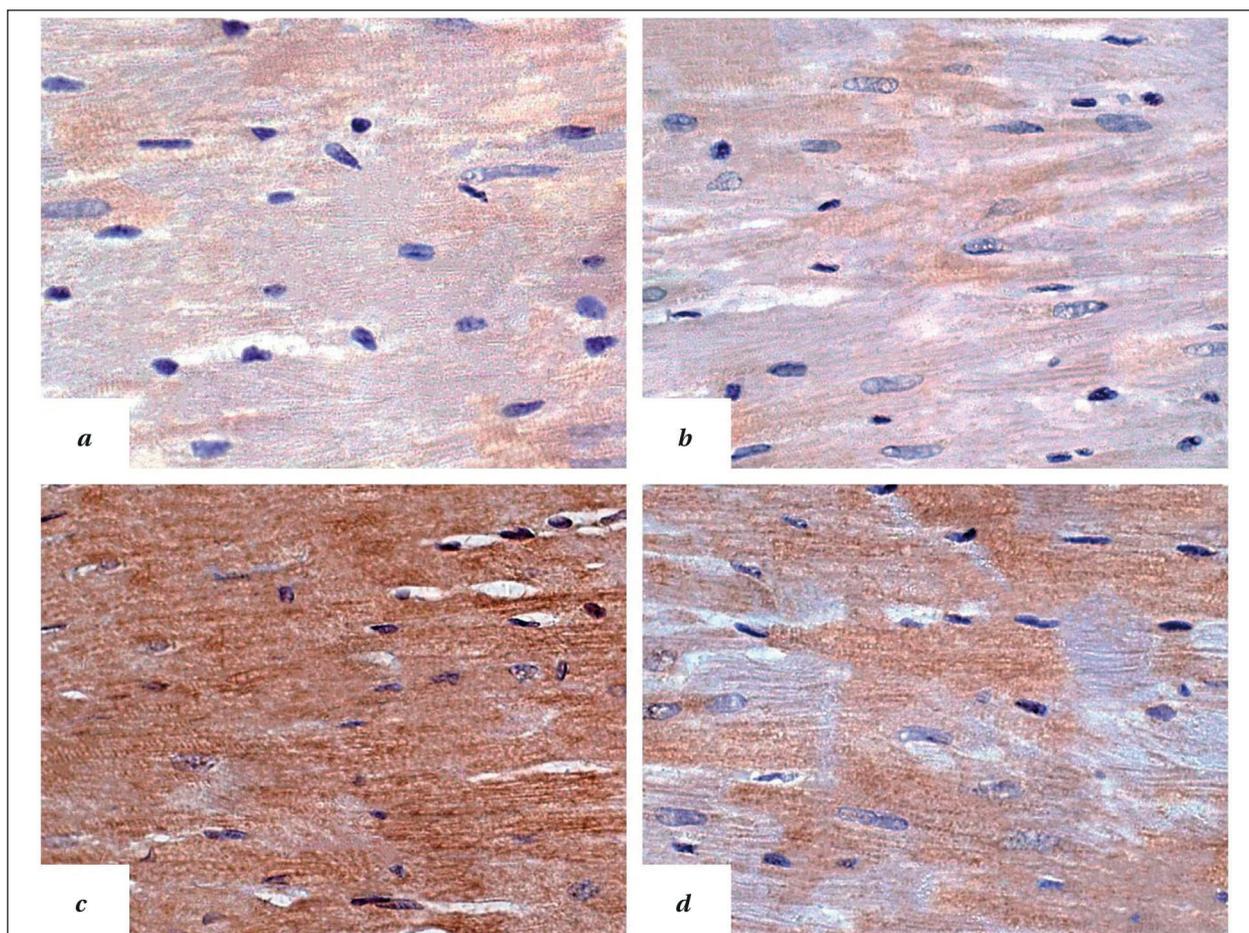
### Обсуждение

Beclin-1 является основной субъединицей фосфатидилинозитол-3-киназного комплекса класса III (Phosphoinositide 3-kinases, PI3K Class III C1), запускающего аутофагию путем продукции фосфатидилинозитол-3-фосфата (Phosphatidylinositol 3-phosphate, PtdIns3P) и дальнейшего рекрутирования генов DFCP1 и WIPI, ответственных за образование изолирующей мембраны и ее отделения от эндоплазматического ретикулума (рис. 4). Кроме того, Beclin-1 входит в состав PI3K Class III C2, основные эффекты которого реализуются на стадии слияния аутофагосомы и лизосомы для обеспечения деградации внутриклеточного субстрата [12–14]. Регистрируемое уве-

личение экспрессии белка Beclin-1 у животных опытной группы, по сравнению с группой контроля, свидетельствует об активации аутофагического потока в посттравматическом периоде экспериментального ушиба сердца.

Активация аутофагии после тупой травмы сердца связана с возникновением в кардиомиоцитах окислительного стресса, повреждением органелл, накоплением активированных форм кислорода (АФК) и ионов Ca<sup>2+</sup>, недостаточным синтезом аденозинтрифосфата (АТФ) и, как следствие, нарастающим энергодефицитом [15–17]. Стресс митохондрий приводит к повышенной продукции в дыхательной цепи АФК, которые являются основными индукторами аутофагического потока и напрямую могут инактивировать комплекс mTOR (mammalian target of rapamycin) (рис. 4), инициируя тем самым процессы аутофагии [18, 19]. Снижение содержания восстановленного глутатиона и общей антиоксидантной способности у травмированных крыс с низкой устойчивостью к стрессу (подгруппа О<sub>Н</sub>) по сравнению с высокоустойчивыми особями (подгруппа О<sub>В</sub>) подтверждает более выраженный оксидативный стресс и закономерное накопление АФК в кардиомиоцитах. Исходя из этой логики, при более высоких уровнях АФК у низкоустойчивых к стрессу животных выраженность процессов аутофагии в поврежденном миокарде также должна быть значительно больше, однако по данным иммуногистохимического исследования экспрессия Beclin-1 у низкоустойчивых к стрессу животных опытной группы была выражена меньше, чем у крыс с высокой стрессоустойчивостью.

Этот факт, возможно, объясняется тем, что в различных условиях (разные модели, различная тяжесть повреждения) последствия реализации аутофагических процессов могут принципиально различаться. Например, при относительно легкой травме аутофагия играет исключительно защитно-приспособительную роль [20], тогда как при более тяжелой травме гиперактивация аутофагического потока или незавершенность ее процессов — в частности, избыточное образование и накопление аутофагосом без их дальнейшего слияния с лизосомами — может привести к гибели клетки [21, 22]. В свою очередь, умеренная концентрация АФК в клетке вызывает усиление процессов аутофагии, способствующих репарации и выживанию клетки (рис. 4). Однако накопление АФК выше определенного уровня может привести к усилению фосфорилирования проапоптотического белка Bcl-2 [23], а также к постоянной активации сигнального пути апоптоза JNK, которые опосредуют клеточную гибель митохондриальными путями, усиливая апоптоз и ингибируя аутофагию [16]. Вероятно, вслед-



**Рис. 3. Экспрессия белка Vesclin-1 в кардиомиоцитах левого желудочка крыс. Продольный срез миокарда.**

**Примечание.** Иммуногистохимическое окрашивание,  $\times 400$ . *a* — контрольная группа, подгруппа с высокой стрессоустойчивостью (КВ); *b* — контрольная группа, подгруппа с низкой стрессоустойчивостью (КН); *a, b* — слабо выраженная цитоплазматическая экспрессия в отдельных кардиомиоцитах; *c* — опытная группа, подгруппа с высокой стрессоустойчивостью (ОВ); цитоплазматическая экспрессия высокой и умеренной интенсивности диффузного характера; *d* — опытная группа, подгруппа с низкой стрессоустойчивостью (ОН); отдельные фокусы кардиомиоцитов с цитоплазматической экспрессией умеренной интенсивности.

ствии чрезмерно высокой концентрации кислородных метаболитов в кардиомиоцитах и низкой исходной стрессоустойчивости животных, обуславливающей чрезмерный уровень напряжения стресс-реализующих систем, травматическое воздействие способствовало сначала запуску аутофагии, а затем, в связи с ее неэффективностью, переключению программы клеточной гибели на путь апоптоза.

Повреждение митохондрий приводит также к снижению синтеза АТФ и нарушению энергетического баланса клеток. Аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа (adenosinemonophosphate-activated proteinkinase, AMPK) является своеобразным датчиком, отслеживающим изменение соотношения АТФ/АМФ и способным в ответ на недостаточное содержание АТФ в клетке запускать аутофагию через инактивацию комплекса mTOR (рис. 4). Аутофагия, выступающая в качестве адаптивного механизма, обеспечивает клетку необходимой энергией за счет деградации поврежденных органелл и

аномальных белков. Однако при нарушении баланса, достигнутого в результате запуска этого резервного механизма, происходит ингибирование аутофагии и запуск апоптотической программы гибели клетки с участием белков Bax/Bak (членов семейства Bcl-2, необходимых для пермеабилзации наружной мембраны митохондрий) или путем прямой активации каспаз вследствие невозможности компенсации клеточного энергодиффицита. Более того, сам процесс аутофагии потребляет большое количество АТФ на всех стадиях — от инициации до образования аутофаголизосомы, в связи с чем значительный энергодиффицит может напрямую нарушать протекание любого этапа аутофагии [24].

Повышение концентрации в крови молочной кислоты после экспериментального ушиба сердца [7] отражает накопление продуктов анаэробного гликолиза и косвенно свидетельствует о развитии в клетках энергодиффицита, а более высокие значения лактата у травмированных животных с низкой стрессоустойчивостью дает основание предпо-

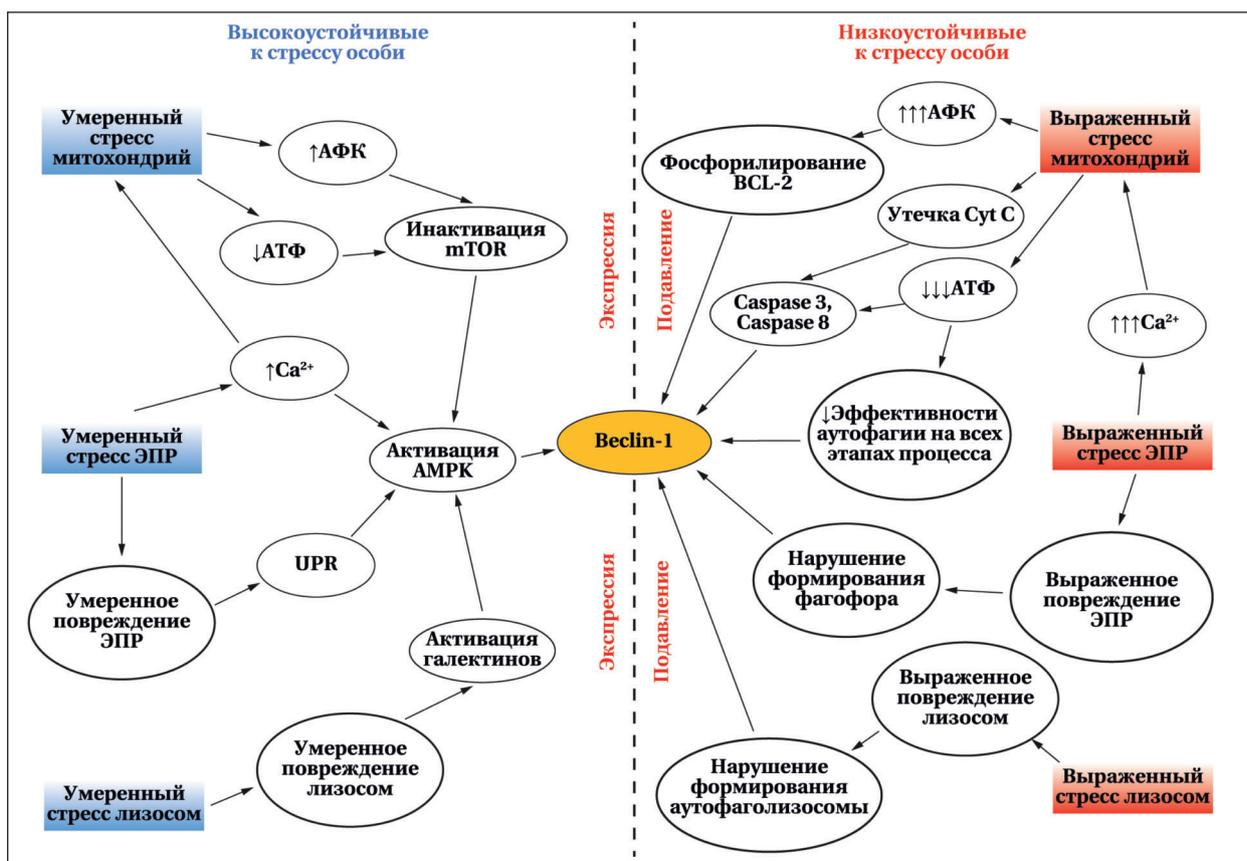


Рис. 4. Экспрессия проаутофагического белка Beclin-1 в зоне повреждения миокарда после моделирования ушиба сердца при различной стрессоустойчивости. Рисунок авторов.

Примечание. ЭПР — эндоплазматический ретикулум; АФК — активированные формы кислорода; АТФ — аденозинтрифосфат; UPR — реакция развернутых белков; mTOR — мишень рапамицина млекопитающих; AMPK — аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа; cyt C — цитохром С.

ложить, что и содержание АТФ в кардиомиоцитах этих особей также было значительно ниже по сравнению с высокоустойчивыми. В этих условиях запуск аутофагии, вероятно, был невозможен или протекание аутофагических реакций было приостановлено на каком-либо этапе.

Вызванный тупой травмой сердца стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) кардиомиоцитов способствует накоплению в нем неправильно свернутых белков, а также высвобождению ионов  $Ca^{2+}$  из ЭПР — основного места хранения внутриклеточного кальция. Оба названных фактора способны запускать процесс аутофагии, причем в первом случае инициация происходит за счет реакции развернутых белков (Unfolded protein response, UPR) и активации трансмембранных белков эндоплазматического ретикулума, опосредованно воздействующих на комплексы AMPK и mTOR (рис. 4). Однако в ситуации значительного структурного повреждения ЭПР процесс аутофагии может быть нарушен или приостановлен на этапе образования фагофора [25].

В свою очередь, повышение концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме приводит к активации комплекса AMPK через кальций/кальмодулин-зависимую протеинкиназу (Calcium/calmodulin-

dependent protein kinase, CaMKK), вследствие чего происходит ингибирование mTOR и запуск аутофагических процессов [17]. Однако вследствие значительного накопления кальция в клетке закономерно увеличивается однонаправленный перенос  $Ca^{2+}$  через мембрану митохондрий, которые, как и ЭПР, являются местом его хранения. Увеличение содержания кальция в митохондриях приводит к значительной активации электронной транспортной цепи с целью образования большего количества АТФ, однако эти процессы сопровождаются утечкой свободных электронов, что приводит к образованию АФК (рис. 4). Более того, избыточный захват кальция митохондриями может вызвать их дисфункцию и утечку цитохрома С, что, в свою очередь, будет способствовать активации каскада каспаз и реализации программы апоптотической гибели клетки [25].

При повреждении лизосом также может происходить утечка ионов  $Ca^{2+}$ , так как в данном случае кальций используется в регуляции аутофагии для облегчения слияния аутофагосомальных и лизосомных мембран. Однако выход  $Ca^{2+}$  из лизосом также вносит вклад в повышение концентрации кальция в цитоплазме и, с одной стороны, запускает аутофагическую репарацию,

а с другой — перегружает дыхательную цепь в митохондриях и может приводить к апоптозу [25]. Кроме того, структурные нарушения лизосом вызывают активацию белков семейства галектинов, которые являются сенсорами лизосомального повреждения и регулируют процессы аутофагии, направленной на репарацию непосредственно лизосом (рис. 4). Однако при значительном их повреждении или неэффективности лизофагии структурно и функционально неполноценные лизосомы тормозят аутофагию на стадии слияния и деградации, что приводит к накоплению в клетке аутофагосом и клеточной гибели вследствие аутофагии, называемой «аутозом». Более того, значительное повреждение лизосомальной мембраны может привести к выходу в цитоплазму катепсинов и гибели клетки [26].

На выраженность экспрессии Beclin-1 могут влиять различные факторы апоптоза, такие как Bcl-2, каспаза 3, каспаза 8, активация которых происходит вследствие чрезмерного повреждения органелл кардиомиоцитов, накопления в цитоплазме АФК,  $Ca^{2+}$ , выраженного дефицита АТФ (рис. 4). Проапоптотический белок Bcl-2 способен ингибировать аутофагию, связываясь с ним в домене BH3, что вызывает диссоциацию Beclin-1 и Vps-34 и высвобождает Beclin-1 из активных комплексов PI3K Class IIIc1 и PI3K Class IIIc2 [13]. При запуске апоптотических процессов активированные каспаза 3 и каспаза 8 способны расщеплять молекулу белка Beclin-1 на фрагменты, которые не обладают аутофагической активностью [13, 27, 28]. Кроме того, продукты расщепления Beclin-1 могут связываться с митохондриальной мембраной, что приводит к высвобождению проапоптотических факторов, ускоряющих процесс апоптоза. Другие аутофагические агенты, такие как Vps-34, Atg5, LC3-II, AMBRA, также могут становиться мишенями апоптотических протеаз, что приводит к ингибированию аутофагии [29].

## Литература

1. Новоселов В.П., Савченко С.В., Кошляк Д.А., Воронковская М.В., Степанищев И.В. Оценка ультраструктурных изменений сократительного аппарата кардиомиоцитов после ушиба сердца. Судебно-медицинская экспертиза. 2010; 53 (2): 13–15. [Novoselov V.P., Savchenko S.V., Koshliak D.A., Voronkovskaia M.V., Stepanishchev I.V. Assessment of ultrastructural changes in the contractile apparatus of cardiomyocytes after heart contusion. *Sud Med Ekspert.* 2010; 53 (2): 13–15. (In Russ.)]. PMID: 20560503.
2. Приймак А.Б., Корпачева О.В., Золотов А.Н. Нерешенные вопросы патогенеза ушиба сердца. Вестник СурГУ. Медицина. 2020; 44 (2): 66–72. [Priymak A.B., Korpacheva O.V., Zolotov A.N. Unresolved issues of pathogenesis of myocardial contusion. *Vestnik SurGU. Medicina.* 2020; 44 (2): 66–72. (In Russ.)]. DOI: 10.34822/2304-9448-2020-2-66-72.
3. Guan D.-W., Zhang X.-G., Zhao R., Lu B., Han Y., Hou Z.-H., Jia J.T. Diverse morphological lesions and serious arrhythmias with hemodynamic insults occur in the early myocardial contusion due to blunt impact in dogs. *Forensic Sci Int.*

Таким образом, более выраженная экспрессия проаутофагического маркера Beclin-1 в посттравматическом периоде экспериментального ушиба сердца у высокоустойчивых к стрессу крыс (подгруппа ОВ) по сравнению с низкоустойчивыми животными (подгруппа ОН) может быть связана с оптимальной реализацией каскада стресс-ассоциированных реакций и меньшей степенью структурного повреждения кардиомиоцитов. Вероятно, реализация защитного эффекта аутофагии за счет устранения дефектных клеточных структур возможна только до определенной степени повреждения кардиомиоцитов, что имело место у высокоустойчивых к стрессу крыс. Превышение этой степени повреждения способно привести к ингибированию аутофагии, что наблюдали у особей с низкой стрессоустойчивостью, и запуску апоптотических процессов. Критерием, косвенно отражающим тяжесть повреждения кардиомиоцитов при экспериментальном ушибе сердца и обусловленное им гемодинамически значимое снижение сократимости миокарда, можно считать показатель летальности, который составил для высокоустойчивых к стрессу животных (подгруппа ОВ) 0%, а для низкоустойчивых (подгруппа ОН) — 25%.

## Заключение

В посттравматическом периоде экспериментального ушиба сердца в зонах повреждения миокарда появляются факторы, способные приводить к активации аутофагии, что подтверждается увеличением экспрессии проаутофагического белка Beclin-1. Выявленность аутофагии различается в зависимости от стрессоустойчивости организма: у высокоустойчивых к стрессу животных наблюдается более высокий уровень экспрессии маркера по сравнению с низкоустойчивыми.

2007; 166 (1): 49–57. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.03.028. PMID: 16697542.

4. Новоселов В.П., Савченко С.В., Кошляк Д.А., Воронковская М.В. Гистохимическое исследование структуры миокарда при ушибе сердца. *Морфология.* 2009; 136 (6): 53–56. [Novoselov V.P., Savchenko S.V., Koshliak D.A., Voronkovskaia M.V. Histochemical study of the myocardium structure in the heart contusion. *Morfologiya.* 2009; 136 (6): 53–56. (In Russ.)]. PMID: 20358774.
5. Acıyayam A., Eser N., Yaylalı A., Karacaodlu Y.C., Yoldas A., Tolun F.I., Aksu E. Effects of amifostine against blunt chest trauma-induced cardiac injury in rats. *Ulus Trauma Acil Cerrahi Derg.* 2023; 29 (3): 266–276. DOI: 10.14744/tjtes.2023.84308. PMID: 36880625.
6. Благоднаров М.Л., Коршунова А.Ю., Азова М.М., Бондарь С.А., Фролов В.А. Аутофагия кардиомиоцитов и морфологические изменения миокарда левого желудочка при острой очаговой ишемии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2016; 160 (3): 398–400. [Blagodarov M.L., Korshunova A.Y., Azova M.M., Bondar' S.A., Frolov V.A. Cardiomyocyte autophagia and morphological

- alterations in the left ventricular myocardium during acute focal ischemia. *Bull Exp Biol Med.* 2016; 160 (3): 398–400. (In Russ.)). DOI: 10.1007/S10517-016-3180-1. PMID: 26742735.
7. Приймак А.Б., Корпачева О.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г. Стратегии адаптации при ушибе сердца у крыс с различной стрессоустойчивостью. *Вестник СурГУ. Медицина.* 2021; 50 (4): 110–116. [Priymak A.B., Korpacheva O.V., Zolotov A.N., Novikov D.G. Strategies for adaptation in rats with various stress resistance after myocardial contusion. *Vestnik SurGU. Medicina.* 2021; 50 (4): 110–116. (In Russ.)). DOI: 10.34822/2304-9448-2021-4-110-116.
  8. Кузнецов А.И., Васильева Т.А. Влияние тонуса симпатoadренальной и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы на функцию кровяных органов у собак с разной стрессовой чувствительностью. *Известия ОГАУ.* 2019; 79 (5): 185–188. [Kuznetsov A.I., Vasilyeva T.A. Influence of the tonus of sympatho-adrenal and hypothalamic-pituitary-adrenal system on the function of hepatogenic organs in dogs with different stress sensibility. *Izvestia Orenburg State Agrarian University.* 2019; 79 (5): 185–188. (In Russ.)].
  9. Приймак А.Б., Корпачева О.В., Золотов А.Н., Ключникова Е.И. Методика ранжирования крыс по стрессоустойчивости и определение объема выборки при экспериментальном ушибе сердца. *Современные проблемы науки и образования.* 2022; 4: 120. [Priymak A.B., Korpacheva O.V., Zolotov A.N., Klyuchnikova E.I. The method of ranking rats by stress resistance and sample size determination in experimental heart contusion. *Current Problems of Science and Education/Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya.* 2022; 4: 120. (In Russ.)]. DOI: 10.17513/spno.31965.
  10. Патент № 374227 Российской Федерация, МПК G09D9/00 (2000.01). Способ моделирования ушиба сердца у мелких лабораторных животных (полезная модель): №2003133897/20 (036729); заявл. 24.11.2003; опубл. 20.04.2004. Долгих В.Т., Корпачева О.В., Ершов А.В.; заявитель Омская государственная медицинская академия; 3 с. [Patent № 374227 Russian Federation, MPK G09D9/00 (2000.01). Mechanism for myocardial contusion simulation in small laboratory animals (useful model): № 2003133897/20 (036729); claim 24.11.03; published 20.04.04. Dolgikh V.T., Korpacheva O.V., Ershov A.V.; applicant and assignee Omsk State Medical Academy; 3 p.].
  11. Патент № 2799815 C1 Российская Федерация, МПК G01N 33/50, G01N 1/30, A61B 5/00. Способ макроскопической паноптической визуализации очагов повреждения и расчета объема поврежденного миокарда при моделировании ушиба сердца (полезная модель): №2023111413; заявл. 03.05.23; опубл. 12.07.23. Ключникова Е.И., Золотов А.Н., Корпачева О.В., Мозговой С.И., Храмых Т.П., Ермолаев П.А.; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 13 с. [Patent № 2799815 C1 Russian Federation, MPK G01N 33/50, G01N 1/30, A61B 5/00. Method of macroscopic panoptic visualization of lesions and calculation of the volume of damaged myocardium when modeling a heart contusion (useful model): № 2023111413; claim 03.05.23; published 12.07.23. Klyuchnikova E.I., Zolotov A.N., Korpacheva O.V., Mozgovoii S.I., Khramykh T.P., Ermolaev P.A.; applicant and assignee Omsk State Medical University; 13 p.].
  12. He C., Levine B. The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22 (2): 140–149. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.01.001. PMID: 20097051.
  13. Maejima Y., Isobe M., Sadoshima J. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2016; 95: 19–25. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.10.032. PMID: 26546165.
  14. Tran S., Fairlie W.D., Lee E.F. BECLIN1: protein structure, function and regulation. *Cells.* 2021; 10 (6): 1522. DOI: 10.3390/cells10061522. PMID: 34204202.
  15. Guo Q.Q., Wang S.-S., Zhang S.-S., Xu H.-D., Li X.-M., Guan Y., Yi F., et al. ATM-CHK2-Beclin 1 axis promotes autophagy to maintain ROS homeostasis under oxidative stress. *EMBO J.* 2020; 39 (10): e103111. DOI: 10.15252/embj.2019103111. PMID: 32187724.
  16. Gao Q. Oxidative stress and autophagy. In: Qin Z.-H. (eds.). *Autophagy: biology and diseases. Advances in experimental medicine and biology.* Springer, Singapore; 2019; 1206: 179–198. DOI: 10.1007/978-981-15-0602-4\_9. ISBN: 978-981-15-0601-7.
  17. Saikia R., Joseph J. AMPK: a key regulator of energy stress and calcium-induced autophagy. *J Mol Med (Berl).* 2021; 99 (11): 1539–1551. DOI: 10.1007/s00109-021-02125-8. PMID: 34398293.
  18. Filomeni G., De Zio D., Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* 2015; 22 (3): 377–388. DOI: 10.1038/cdd.2014.150. PMID: PMC4326572.
  19. Wang Y., Zhang H. Regulation of autophagy by mTOR signaling pathway. In: Qin Z.-H. (eds.). *Autophagy: biology and diseases. Advances in experimental medicine and biology.* Springer, Singapore; 2019; 1206: 67–83. DOI: 10.1007/978-981-15-0602-4\_3. ISBN: 978-981-15-0601-7.
  20. Viscomi M.T., D'Amelio M., Cavallucci V., Latini L., Bisicchia E., Nazio F., Fanelli F., et al. Stimulation of autophagy by rapamycin protects neurons from remote degeneration after acute focal brain damage. *Autophagy.* 2012; 8 (2): 222–235. DOI: 10.4161/auto.8.2.18599. PMID: 22248716
  21. Sakai K., Fukuda T., Iwadate K. Immunohistochemical analysis of the ubiquitin proteasome system and autophagy lysosome system induced after traumatic intracranial injury: association with time between the injury and death. *Am J Forensic Med Pathol.* 2014; 35 (1): 38–44. DOI: 10.1097/PAF.0000000000000067. PMID: 24317096.
  22. He M., Ding Y., Chu C., Tang J., Xiao Q., Luo Z.G. Autophagy induction stabilizes microtubules and promotes axon regeneration after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113 (40): 11324–11329. DOI: 10.1073/pnas.1611282113. PMID: 27638205.
  23. Chen Y., Zhang W., Guo X., Ren J., Gao A. The crosstalk between autophagy and apoptosis was mediated by phosphorylation of Bcl-2 and beclin1 in benzene-induced hematotoxicity. *Cell Death Dis.* 2019; 10 (10): 772. DOI: 10.1038/s41419-019-2004-4. PMID: 31601785.
  24. Yang J., Zhou R., Ma Z. Autophagy and energy metabolism. In: Qin Z.-H. (eds.). *Autophagy: biology and diseases. Advances in experimental medicine and biology.* Springer, Singapore; 2019; 1206: 329–357. DOI: 10.1007/978-981-15-0602-4\_16. ISBN: 978-981-15-0601-7.
  25. Hu Y.-X., Han X.-S., Jing Q. Ca (2+) Ion and Autophagy. In: Qin Z.-H. (eds.). *Autophagy: biology and diseases. Advances in experimental medicine and biology.* Springer, Singapore; 2019; 1206: 151–166. DOI: 10.1007/978-981-15-0602-4\_7. ISBN: 978-981-15-0601-7.
  26. Ballabio A., Bonifacino J.S. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020; 21 (2): 101–118. DOI: 10.1038/s41580-019-0185-4. PMID: 31768005.
  27. Zhu Y., Zhao L., Liu L., Gao P., Tian W., Wang X., Jin H., et al. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein Cell.* 2010; 5 (1): 468–477. DOI: 10.1007/s13238-010-0048-4. PMID: 21203962.
  28. Cho D.-H., Jo Y.K., Hwang J.J., Lee Y.M., Roh S.A., Kim J.C. Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer Lett.* 2009; 274 (1): 95–100. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.09.004. PMID: 18842334.
  29. Pagliarini V., Wirawan E., Romagnoli A., Ciccosanti F., Lisi G., Lippens S., Cecconi F., et al. Proteolysis of Ambra1 during apoptosis has a role in the inhibition of the autophagic pro-survival response. *Cell Death Differ.* 2012; 19 (9): 1495–1504. DOI: 10.1038/cdd.2012.27. PMID: 22441670.

Поступила 01.06.2023  
Принята 21.09.2023