

**ЭКСПРЕССИЯ ДЕСМИНА В МИОКАРДЕ КРЫС
С ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТЬЮ
В ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ УШИБА СЕРДЦА**

¹Ключникова Е.И., ¹Мозговой С.И., ¹Золотов А.Н., ¹Корпачева О.В., ¹Кононов А.В.

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Омск, e-mail: kei_omsk@mail.ru

Оценить экспрессию структурного белка десмина в миокарде крыс с высокой и низкой стрессоустойчивостью в динамике посттравматического периода ушиба сердца. Исследование выполнено на 106 белых нелинейных крысах-самцах. Крыс ранжировали на группы по стрессоустойчивости, из животных с крайними вариантами стрессоустойчивости формировали контрольную и опытную группы, в каждой из которых формировали подгруппы с высокой и низкой стрессоустойчивостью и в соответствии с тремя исследовательскими точками посттравматического периода 6, 12 и 24 ч. У особей из подгрупп опытной группы моделировали ушиб сердца, из участков наибольшего повреждения миокарда изготавливали гистологические срезы, проводили иммуногистохимическую реакцию с моноклональными мышинными антителами Anti-Desmin. Иммуногистохимическое исследование выявило статистически значимое снижение ($p < 0,0001$) экспрессии десмина и количества вставочных дисков ($p < 0,0001$) в зонах повреждения миокарда особей опытной группы по сравнению с контрольной вне зависимости от стрессоустойчивости, при этом подгруппы низкоустойчивых к стрессу животных демонстрировали более низкие показатели в сравнении с высокоустойчивыми особями. Снижение экспрессии десмина в посттравматическом периоде экспериментального ушиба сердца свидетельствует о структурных нарушениях кардиомиоцитов, при этом их выраженность различается в зависимости от стрессоустойчивости животного.

Ключевые слова: ушиб сердца, десмин, миокард, стрессоустойчивость.

**EXPRESSION OF DESMIN IN THE MYOCARDIUM
OF RATS WITH HIGH AND LOW STRESS RESISTANCE
IN THE POSTTRAUMATIC PERIOD OF CARDIAC CONTUSION**

¹Klyuchnikova E.I., ¹Mozgovoi S.I., ¹Zolotov A.N., ¹Korpacheva O.V., ¹Kononov A.V.

¹Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation, e-mail: kei_omsk@mail.ru

To evaluate the expression of the structural protein desmin in the myocardium of rats with high and low stress resistance in the dynamics of the post-traumatic period of cardiac contusion. The study was performed on 106 white nonlinear male rats. The rats were ranked into groups by stress resistance, animals with extreme stress resistance variants were used to form control and experimental groups, each of which was divided into subgroups with high and low stress resistance and in accordance with three research points of the post-traumatic period of 6, 12 and 24 hours. In individuals from the subgroups of the experimental group, cardiac contusion was modeled, histological sections were made from areas of the greatest myocardial damage, an immunohistochemical reaction was performed with monoclonal mouse antibodies Anti-Desmin. Immunohistochemical study revealed a statistically significant decrease ($p < 0,0001$) in desmin expression and the number of intercalated discs ($p < 0,0001$) in the myocardial damage zones of the experimental group compared to the control group, regardless of stress resistance, while subgroups of animals with low stress resistance demonstrated lower indicators compared to highly resistant individuals. A decrease in desmin expression in the post-traumatic period of experimental cardiac contusion indicates structural disturbances in cardiomyocytes, and their severity varies depending on the animal's stress resistance.

Keywords: cardiac contusion, desmin, myocardium, stress resistance.

Введение

Повреждение кардиомиоцитов в посттравматическом периоде ушиба сердца обусловлено как нарушением структурной организации клеток вследствие первично-механического воздействия, так и вторично-ишемическими механизмами с последующим закономерным развитием биоэнергетической гипоксии [1; 2]. Экспериментальные исследования на моделях острой ишемии миокарда демонстрируют, что в ишемизированных кардиомиоцитах происходит деструкция цитоскелетного белка десмина [3]. В единичных публикациях, касающихся травматического повреждения сердца, также установлен факт деградации десмина как следствие механического повреждения [4].

При этом в патогенезе тупой травмы сердца значительную роль играет адаптация организма к действию стрессового фактора, реализуемая в рамках стресс-реакции. Ранее авторами была показана разница в течении посттравматического периода экспериментального ушиба сердца у крыс с высокой и низкой стрессоустойчивостью на основании различия биохимических показателей [5] и экспрессии иммуногистохимических маркеров [6].

Исходя из этого, авторы предположили, что у высоко- и низкоустойчивых к стрессу особей после моделирования тупой травмы сердца возможны различные варианты структурных нарушений кардиомиоцитов, в частности разные уровни экспрессии цитоскелетного белка десмина в динамике посттравматического периода ушиба сердца.

Цель исследования

Оценка экспрессии структурного белка десмина в миокарде крыс с высокой и низкой стрессоустойчивостью в динамике посттравматического периода ушиба сердца.

Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнен на 106 белых беспородных крысах-самцах массой 250-300 г, содержащихся в помещении с контролируемой температурой (22 ± 2 °C) при свободном доступе к комбинированному корму и воде в соответствии с правилами проведения работ и содержания животных (Приказ Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики»). Протокол эксперимента был одобрен локальным этическим комитетом Омского государственного медицинского университета (протокол № 140 от 13.10.2021). На всех инвазивных этапах эксперимента использовали ветеринарный препарат Золетил 100 (тилетамин, золазепам) в дозе 30 мг/кг внутривенно.

Разделение крыс на группы по стрессоустойчивости проводили с помощью тестов «Принудительное плавание» по Порсолту в модификации М.С. Зайцевой и соавт. [7] и «Открытое поле», подробно процедура ранжирования животных изложена в предыдущих публикациях авторов [8].

Далее крыс разделили на группы в зависимости от уровня выявленной

стрессоустойчивости: с высокой ($n = 32$), средней ($n = 42$) и низкой ($n = 32$) стрессоустойчивостью, при этом особи со средней устойчивостью к стрессу были исключены из дальнейшего эксперимента в соответствии с целью исследования. Из животных с высокой и низкой стрессоустойчивостью сформировали контрольную ($n = 16$) и опытную ($n = 48$) группы. В контрольную группу (К) включили две подгруппы животных: с высокой (КВ) и низкой (КН) стрессоустойчивостью. В опытную группу (О) вошли шесть подгрупп в соответствии с тремя исследовательскими точками посттравматического периода: с высокой и низкой стрессоустойчивостью и длительностью эксперимента 6, 12 и 24 ч. В итоге было сформировано восемь подгрупп (КВ, КН, ОВ-6, ОН-6, ОВ-12, ОН-12, ОВ-24, ОН-24) по 8 животных в каждой.

У особей из подгрупп опытной группы моделировали ушиб сердца при помощи оригинального устройства, имитирующего удар передней поверхности грудной клетки о стойку руля [9]. Затем через 6, 12 или 24 ч после травмы в зависимости от исследовательской точки (для особей подгрупп ОВ-6 и ОН-6, ОВ-12 и ОН-12, ОВ-24 и ОН-24 соответственно) сердца крыс извлекали и изготавливали срезы сердца, после чего окрашивали их раствором нитросинего тетразолия для определения зон наибольшего повреждения [6].

Из межжелудочковой перегородки, передних стенок левого и правого желудочков сердца выделили фрагменты размером 5x5 мм, фиксировали формалином, обезживали в спиртах нисходящей концентрации, заливали в парафиновые блоки. Гистологические срезы изготавливали на микротоме Eprelia HM 340E (Eprelia, Великобритания), наносили на стекла с адгезивным покрытием, депарафинизировали ксилолом, окрашивали, просветляли в карбоксиле и накрывали покровными стеклами. Для оценки экспрессии структурного белка десмина проводили иммуногистохимическую реакцию с моноклональными мышинными антителами Anti-Desmin («Линбери Лаб», Россия), клон GM007, разведение 1:100, согласно рекомендациям производителя антител. Визуализацию иммуногистохимического окрашивания осуществляли с помощью «Универсальной двухстадийной системы детекции PrimeVision: антитела к IgG мыши/кролика – HRP/DAB» («ПраймБиоМед», Россия), после чего образцы докрашивали гематоксилином.

Иммуногистохимическую реакцию считали положительной при появлении окрашивания коричневого цвета в цитоплазме кардиомиоцитов, а также при наличии коричневого окрашивания вставочных дисков в местах соединения кардиомиоцитов. Микроскопию проводили на микроскопе Axioskop 40 (Zeiss, Германия) при 400-кратном увеличении в 10 полях зрения в каждом препарате. Поля зрения фиксировали в виде снимков с помощью камеры AxioCam 503 color (Zeiss, Германия) и графической программы ZenBlue.

Анализ результатов иммуногистохимического исследования миокарда проводили с

учетом двух параметров: оценки цитоплазматического окрашивания кардиомиоцитов и окрашивания вставочных дисков. Цитоплазматическое окрашивание оценивали полуколичественным методом, при этом интенсивность иммуногистохимической окраски определяли по четырехбалльной шкале (0 – отсутствие окрашивания, 1 – слабая интенсивность окрашивания, 2 – умеренная интенсивность окрашивания, 3 – выраженное окрашивание). Площадь цитоплазматического окрашивания оценивали с использованием паттернов, отражающих процент окрашенных кардиомиоцитов от всех кардиомиоцитов в поле зрения, и присваивали соответствующий балл (0-20% – 0 баллов, 21-40% – 1 балл, 41-60% – 2 балла, 61-80% – 3 балла, 81-100% – 4 балла). После умножения балла интенсивности на балл площади окрашивания получали индекс экспрессии (максимум 12 баллов) для каждого поля зрения. Далее для всех 10 полей зрения каждого отдельного образца рассчитывали среднее арифметическое значение и индекс экспрессии. Окрашивание вставочных дисков оценивали с использованием количественного метода подсчета в 10 полях зрения для каждого препарата, после чего рассчитывали среднее арифметическое значение для каждой отдельной особи.

Количественные переменные проверяли на нормальность распределения с использованием тестов Шапиро - Уилка и Колмогорова - Смирнова. Во всех сравниваемых группах индексы экспрессии десмина имели распределение, отличное от нормального, вследствие чего полученные данные обрабатывали непараметрическими методами. Результаты представили в формате медианы (Me) и межквартильного интервала (Q_1 - Q_3). Для обработки исследовательских групп использовали непараметрический аналог однофакторного дисперсионного анализа ANOVA – критерий Краскела - Уоллиса. После сравнения нескольких групп было проведено апостериорное сравнение post-hoc. Данные обрабатывали в программе Statistica 10. Статистически значимыми считали $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

По результатам иммуногистохимического исследования выявлено статистически значимое снижение экспрессии структурного белка десмина ($p < 0,0001$) и количества вставочных дисков ($p < 0,0001$) в зонах повреждения миокарда особей опытной группы по сравнению с контрольной (рис. 1). В данных иммуногистохимического исследования миокарда крыс контрольных подгрупп (КВ и КН) значимых различий выявлено не было. В опытных подгруппах отмечали постепенное снижение экспрессии десмина и количества вставочных дисков с увеличением срока посттравматического периода, при этом подгруппы низкоустойчивых к стрессу животных демонстрировали более низкие показатели в сравнении с высокоустойчивыми особями (рис. 1).

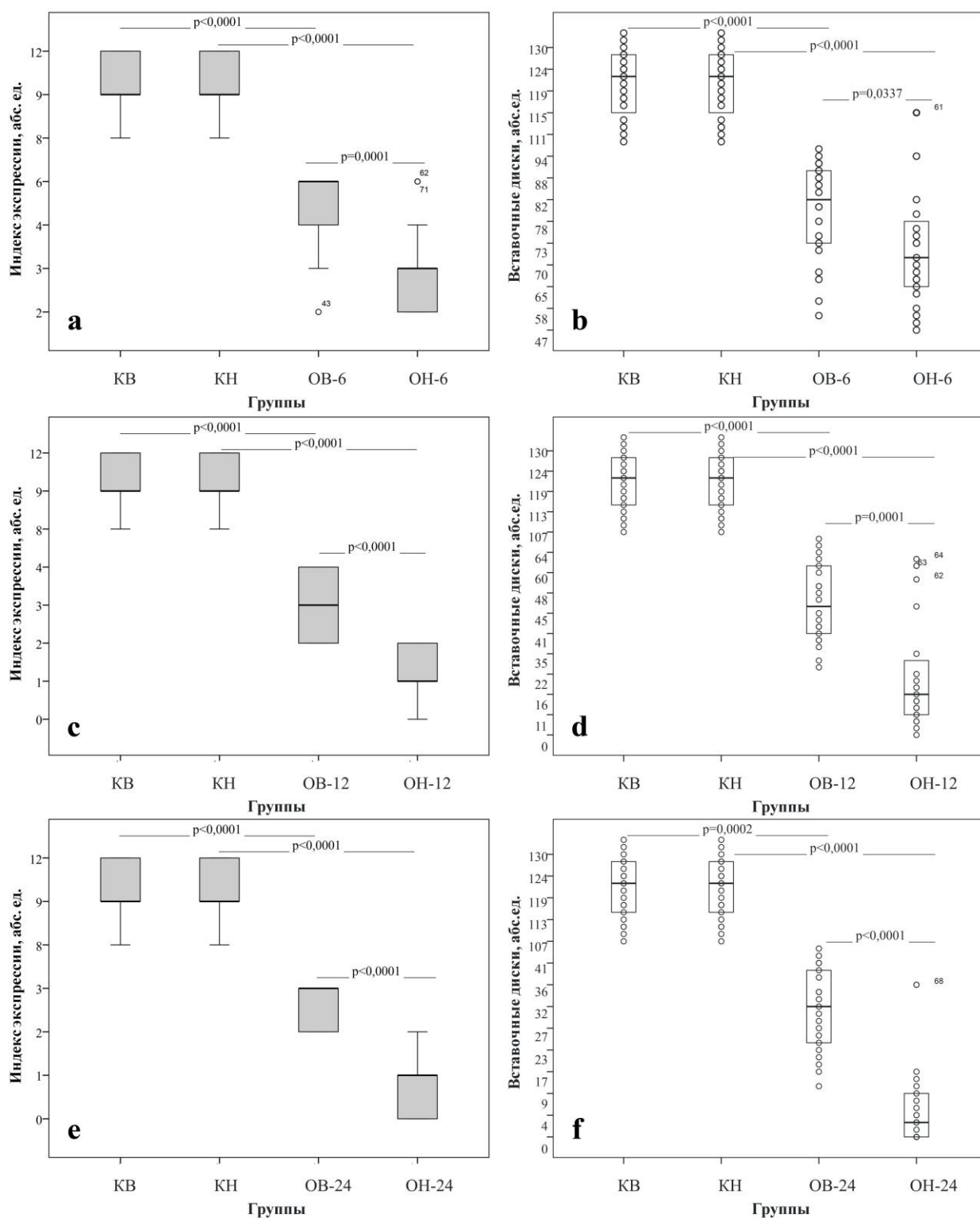


Рис. 1. Индексы экспрессии десмина (боксплоты – **a**, **c**, **e**) и количество вставочных дисков (диаграммы рассеяния – **b**, **d**, **f**) в миокарде крыс с высокой и низкой стрессоустойчивостью контрольных подгрупп (KV, KH) и опытных подгрупп в исследовательских точках 6 ч (OB-6, OH-6), 12 ч (OB-12, OH-12) и 24 ч (OB-24, OH-24) Примечание: достоверность различий между исследуемыми группами выражена в абсолютных значениях p .

В исследовательской точке 6 часов посттравматического периода уровень экспрессии десмина в миокарде высокоустойчивых к стрессу крыс (ОВ-6) был выше, чем у низкоустойчивых к стрессу особей (ОН-6) (рис. 1а). При количественной оценке вставочных дисков в миокарде крыс подгруппы ОВ-6 также были выявлены более высокие значения по сравнению с подгруппой ОН-6 (рис. 1б). Аналогичные различия в экспрессии десмина и количестве вставочных дисков между высоко- и низкоустойчивыми к стрессу животными наблюдали в исследовательских точках 12 ч (рис. 1 с, d) и 24 ч (рис. 1 е, f).

При качественной оценке экспрессии десмина в миокарде крыс контрольных подгрупп (КВ, КН) было выявлено однородное иммуногистохимическое окрашивание коричневого цвета высокой интенсивности диффузного характера с четким контурированием вставочных дисков в местах соединения кардиомиоцитов во всех полях зрения (рис. 2 а, b). В миокарде крыс, сердца которых извлекали через 6 ч после травмы, иммуногистохимическая реакция представляла собой окрашивание умеренной или высокой интенсивности диффузного или мозаичного характера, при этом интенсивность окрашивания вставочных дисков и их количество заметно снижались по сравнению с подгруппами контроля (рис. 2 с, d). В исследовательской точке 12 ч в миокарде особей подгрупп ОВ-12 и ОН-12 отмечали отдельные фокусы цитоплазматического окрашивания низкой и/или умеренной интенсивности, вставочные диски имели неоднородную слабоинтенсивную окраску (рис. 2 е, f). В подгруппе крыс с высокой стрессоустойчивостью и длительностью посттравматического периода 24 ч (подгруппа ОВ-24) наблюдали фокусы с окраской низкой интенсивности и/или отсутствие иммуногистохимического окрашивания, определялись группы кардиомиоцитов с сохранными вставочными дисками между ними и области отсутствия вставочных дисков (рис. 2g). При оценке участков поврежденного миокарда животных подгруппы ОН-24 было выявлено отсутствие цитоплазматического окрашивания во всех полях зрения и единичные с трудом определяемые вставочные диски с низкой интенсивностью окрашивания (рис. 2h).

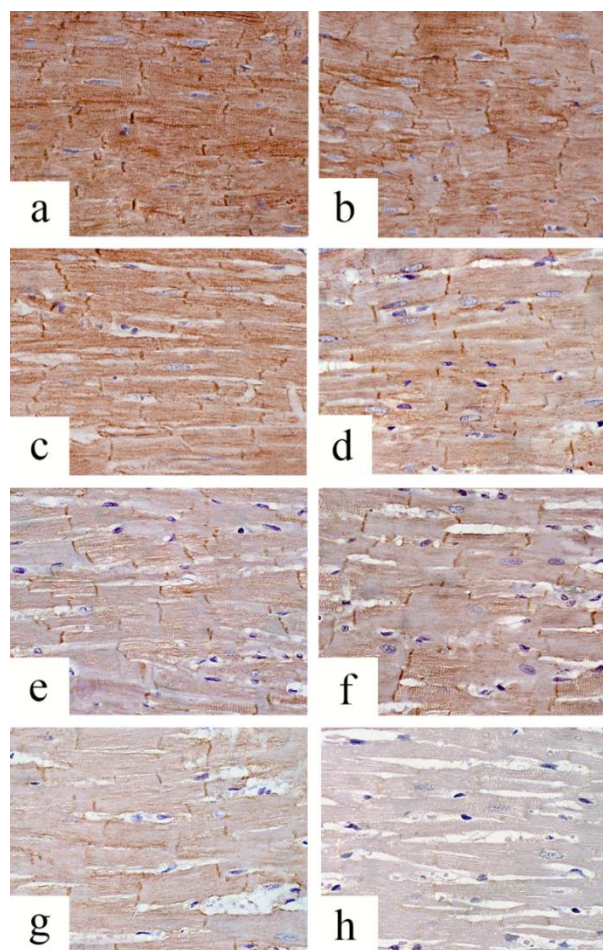


Рис. 2. Экспрессия десмина в миокарде крыс в посттравматическом периоде экспериментального ушиба сердца. Продольный срез миокарда. Иммуногистохимическая реакция с моноклональными мышинными антителами Anti-Desmin, увеличение $\times 400$

Примечание: а, b – миокард крыс контрольных подгрупп с высокой и низкой стрессоустойчивостью (подгруппы KB, КН); с, d – миокард крыс опытных подгрупп с высокой и низкой стрессоустойчивостью в исследовательских точках 6 ч (подгруппы ОВ-6, ОН-6); е, f – 12 ч (подгруппы ОВ-12, ОН-12); g, h – 24 ч (подгруппы ОВ-24, ОН-24). Более детальная характеристика отдельных изображений представлена в тексте.

Цитоскелетный белок десмин локализуется в цитоплазме кардиомиоцитов в виде нитей, формируя клеточный каркас и связывая компоненты сократительного аппарата в единую функциональную сеть (сократительные белки, Z-линии, саркоплазматический ретикулум, митохондрии), а также во вставочных дисках, обеспечивая при этом соединение соседних кардиомиоцитов и передачу между ними потенциала действия [10].

Во многих экспериментальных и клинических исследованиях на моделях острой ишемии сердца, хронической сердечной недостаточности, тупой травмы сердца снижение экспрессии десмина свидетельствует о его деструкции [3; 4; 11], которую могут запускать такие факторы, как изменение pH тканей и последующая активация протеаз, появление активированных форм кислорода (АФК), снижение активности фосфорилирования белков из-за ишемии или вызванная гипоксией деполимеризация клеточных структур [12; 13].

Обусловленное этим разрушение эпитопа десмина способствует утрате его способности реагировать с антителами при проведении иммуногистохимической реакции [14].

По мнению авторов, более значительное снижение экспрессии десмина у низкоустойчивых к стрессу особей в сравнении с высокоустойчивыми особями может отражать более тяжелое механическое и гипоксическое повреждение кардиомиоцитов в условиях тупой травмы сердца. При этом менее тяжелое структурное повреждение миокарда у крыс с высокой стрессоустойчивостью, вероятно, обеспечивает относительную сохранность цитоскелетных белков, в том числе за счет активации тканевой стресс-ассоциированной реакции аутофагии.

Усиление деструкции десмина в миокарде крыс в динамике посттравматического периода ушиба сердца вне зависимости от уровня стрессоустойчивости может быть объяснено постепенным накоплением в цитоплазме кардиомиоцитов АФК, Ca^{2+} , нарастанием гипоксии и энергодефицита. У особей с низкой устойчивостью к стрессу дополнительным фактором деструкции десмина, вероятно, служит активация апоптотических процессов в исследовательских точках 12 и 24 ч. Приведенные положения могут быть подтверждены как собственными исследованиями авторов [6], так и иными публикациями, в которых рассматриваются феномены запрограммированной клеточной гибели кардиомиоцитов [15; 16].

Заключение

В посттравматическом периоде экспериментального ушиба сердца происходит постепенное снижение экспрессии цитоскелетного белка десмина в зонах повреждения миокарда вне зависимости от стрессоустойчивости животных. Однако выраженность и динамика экспрессии белка различается у животных с высокой и низкой стрессоустойчивостью: снижение уровней экспрессии десмина у низкоустойчивых к стрессу особей более выражено в сравнении с высокоустойчивыми и отражает более значительные структурные повреждения кардиомиоцитов. Таким образом, полученные результаты демонстрируют различную степень деструкции цитоскелетного белка десмина в альтерированном миокарде в посттравматическом периоде ушиба сердца, обусловленную индивидуальной устойчивостью организма к стрессу.

Список литературы

1. Приймак А.Б., Корпачева О.В., Золотов А.Н. Нерешенные вопросы патогенеза ушиба сердца // Вестник СурГУ. Медицина. 2020. № 44 (2). С. 66-72.
DOI: 10.34822/2304-9448-2020-2-66-72.

2. 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.* 2007. Vol. 166. Is. 1. P. 49-57.
DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.03.028.
3. Hu B.J., Zhu J.Z. Sequence and time course of depletion of cardiac cellular proteins and accumulation of plasma proteins in rat early ischemic myocardium // *Leg Med (Tokyo)*. 2019. Is. 38. P. 36-44. DOI: 10.1016/j.legalmed.2019.04.001.
4. Kalbitz M., Amann E.M., Bosch B., Palmer A., Schultze A., Pressmar J., Weber B., Wepler M., Gebhard F., Schrezenmeier H., Brenner R., Huber-Lang M. Experimental blunt chest trauma-induced myocardial inflammation and alteration of gap-junction protein connexin 43 // *PLoS One*. 2017. Vol. 12. Is. 11. P. 0187270. DOI: 10.1371/journal.pone.0187270.
5. Приймак А.Б., Корпачева О.В., Золотов А.Н., Ключникова Е.И. Влияние блокады минералокортикоидных рецепторов на стратегию адаптации крыс с различной стрессоустойчивостью в посттравматическом периоде ушиба сердца // *Вестник СурГУ. Медицина*. 2022. № 3 (53). С. 74-82. DOI: 10.34822/2304-9448-2022-3-74-82.
6. Ключникова Е.И., Корпачева О.В., Мозговой С.И., Золотов А.Н., Кононов А.В. Экспрессия Beclin-1 и Caspase 3 в посттравматическом периоде экспериментального ушиба сердца у крыс с различной стрессоустойчивостью // *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2024. №9 (2). С. 8-19. DOI: 10.23946/2500-0764-2024-9-2-8-19.
7. Зайцева М.С., Иванов Д.Г., Александровская Н.В. Работоспособность крыс в тесте «Вынужденное плавание с грузом» и причины её вариабельности // *Биомедицина*. 2015. №4. С. 30-42.
8. Золотов А.Н., Ключникова Е.И., Корпачева О.В., Приймак А.Б. Сократительная функция миокарда в посттравматическом периоде ушиба сердца у крыс с различной стрессоустойчивостью // *Кубанский научный медицинский вестник*. 2024. № 5 (31). С. 41-72. DOI: 10.25207/1608-6228-2024-31-5-41-72.
9. Долгих В.Т., Корпачева О.В., Ершов А.В. Устройство для моделирования ушиба сердца у мелких лабораторных животных // Патент № RU 37427 U1. Российская Федерация, МПК G09B 9/00 (2000.01). Заявка № 2003133897/20, 24.11.2003; опубл. 20.04.2004. Патентообладатель: Омская государственная медицинская академия. 2004.
10. Agnetti G., Herrmann H., Cohen S. New roles for desmin in the maintenance of muscle homeostasis // *FEBS J.* 2022. Vol. 289. Is. 10. P. 2755-2770. DOI: 10.1111/febs.15864.
11. Moneo-Corcuera D., Viedma-Poyatos Á., Stamatakis K., Pérez-Sala D. Desmin Reorganization by Stimuli Inducing Oxidative Stress and Electrophiles: Role of Its Single Cysteine Residue // *Antioxidants (Basel)*. 2023. Vol. 12. Is. 9. P. 1703. DOI: 10.3390/antiox12091703.

12. Zhang J., Yu Q., Han L., Han M., Han G. Effects of lysosomal iron involvement in the mechanism of mitochondrial apoptosis on postmortem muscle protein degradation // Food Chem. 2020. Is. 328. P. 127174. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127174.
13. Malheiros J.M., Braga C.P., Grove R.A., Ribeiro F.A., Calkins C.R., Adamec J., Chardulo L.A.L. Influence of oxidative damage to proteins on meat tenderness using a proteomics approach // Meat Sci. 2019. Is. 148. P. 64-71. DOI: 10.1016/j.meatsci.2018.08.016.
14. Bouvet M., Dubois-Deruy E., Turkieh A., Mulder P., Peugeot V., Chwastyniak M., Beseme O., Dechaumes A., Amouyel P., Richard V., Lamblin N., Pinet F. Desmin aggregophagy in rat and human ischemic heart failure through PKC ζ and GSK3 β as upstream signaling pathways // Cell Death Discov. 2021. Vol. 7. Is. 1. P. 153. DOI: 10.1038/s41420-021-00549-2.
15. Ma X., Mani K., Liu H., Kovacs A., Murphy J.T., Foroughi L., French B.A., Weinheimer C.J., Kraja A., Benjamin I.J., Hill J.A., Javaheri A., Diwan A. Transcription Factor EB Activation Rescues Advanced α B-Crystallin Mutation-Induced Cardiomyopathy by Normalizing Desmin Localization // J Am Heart Assoc. 2019. Vol. 8. Is. 4. P. 010866. DOI: 10.1161/JAHA.118.010866.
16. Wu Z., Chen G., Zhang J., Hua Y., Li J., Liu B., Huang A., Li H., Chen M., Ou C. Treatment of Myocardial Infarction with Gene-modified Mesenchymal Stem Cells in a Small Molecular Hydrogel // Sci Rep. 2017. Vol. 7. Is. 1. P. 15826. DOI: 10.1038/s41598-017-15870-z.