

УДК: 616.12-001.31-092.9

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2024-9-2-8-19>

ЭКСПРЕССИЯ BECLIN-1 И CASPASE 3 В ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УШИБА СЕРДЦА У КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТЬЮ

КЛЮЧНИКОВА Е.И.*, КОРПАЧЕВА О.В., МОЗГОВОЙ С.И., ЗОЛотов А.Н., КОНОНОВ А.В.

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Омск, Россия

Резюме

Цель. Оценка активности аутофагии и апоптоза в миокарде крыс с различной стрессоустойчивостью после моделирования ушиба сердца.

Материалы и методы. Исследование проводили на 106 белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г. Крыс ранжировали по стрессоустойчивости, среднеустойчивых особей ($n = 42$) исключили из эксперимента. Из оставшихся животных сформировали контрольную ($n = 16$) и опытную ($n = 48$) группы, в контрольную вошли подгруппы с высокой и низкой стрессоустойчивостью, в опытную включили шесть подгрупп в соответствии с тремя исследовательскими точками посттравматического периода: с высокой и низкой стрессоустойчивостью и длительностью эксперимента 6, 12 и 24 часа. Таким образом сформировали восемь подгрупп по 8 животных в каждой. В опытной группе моделировали ушиб сердца. Через 6, 12 и 24 часа соответственно сердца крыс извлекали, далее из зон, подверженных наибольшему травматическому воздействию (межжелудочковой перегородки, передних стенок левого и правого желудочков), иссекали фрагменты миокарда 5х5 мм, изготавливали гистологические срезы и проводили иммуногистохимическое исследование с антителами к маркерам Beclin-1 и Caspase 3. Полученные образцы исследовали под микроскопом.

Результаты. В миокарде крыс после ушиба сердца была выявлена экспрессия маркеров Beclin-1 и Caspase 3. У крыс с высокой стрессоустойчивостью отмечалось нарастание индекса экспрессии Beclin-1 в динамике посттравматического периода, а у животных с низкой стрессоустойчивостью наблюдалось постепенное снижение. У высокоустойчивых крыс экспрессия Caspase 3 регистрировалась только через 24 часа после травмы, а у низкоустойчивых животных наблюдалось нарастание экспрессии в динамике посттравматического периода.

Заключение. Экспрессия Beclin-1 в миокарде крыс опытной группы свидетельствует о запуске аутофагии, а экспрессия Caspase 3 – об активации апоптоза. Выраженность данных реакций неодинакова у животных с разной стрессоустойчивостью.

Ключевые слова: ушиб сердца, аутофагия, Beclin-1, апоптоз, Caspase 3, стрессоустойчивость.

Конфликт интересов

Е. И. Ключникова, О. В. Корпачева, С. И. Мозговой, А. Н. Золотов, А. В. Кононов заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования:

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): 8-19. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2024-9-2-8-19>

*Корреспонденцию адресовать:

Ключникова Евгения Игоревна, 644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12, E-mail: kei_omsk@mail.ru
© Ключникова Е. И. и др.

ORIGINAL RESEARCH

EXPRESSION OF BECLIN-1 AND CASPASE-3 AFTER THE MYOCARDIAL CONTUSION IN RATS WITH HIGH AND LOW STRESS RESISTANCE

EVGENIA I. KLYUCHNIKOVA *, OLGA V. KORPACHEVA, SERGEI I. MOZGOVOI,
ALEXANDER N. ZOLOTOV, ALEXEI V. KONONOV

Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Abstract

Aim. To evaluate the activity of autophagy and apoptosis in the myocardium of rats with different stress resistance after the modeling of myocardial contusion.

Materials and Methods. The study was performed on 106 white male rats weighing 250-300 g. The rats were ranked according to stress tolerance, and medium-resistant individuals (n = 42) were excluded from the experiment. Control (n = 16) and experimental (n = 48) groups were formed from the remaining animals; the control group included subgroups with high and low stress resistance, and the experimental group included 6 subgroups (rats with high and low stress resistance; 6, 12, and 24-hour time points). Each of the subgroups included 8 animals. Myocardial contusion was modeled in the experimental group. At 6-, 12- and 24-hour time point, rat hearts have been excised and 5×5 mm myocardial fragments were dissected from the areas with the most prominent traumatic effects (interventricular septum, anterior walls of the left and right ventricles). Tissues were then sectioned and stained with antibodies to Beclin-1 and caspase-3.

Results. We have documented a significant expression of Beclin-1 and Caspase 3 expression in rat hearts after myocardial contusion. From 6 to 24 hours upon the myocardial contusion, Beclin-1 expression has been increased in rats with high stress resistance but was reduced in rats with low stress resistance. Expression of caspase-3 expression was registered exclusively at 24-hour time point in rats with high stress resistant but increased along the time points in rats with low stress resistance.

Conclusion. Expression of Beclin-1 and caspase-3 in rat myocardium indicated autophagy and apoptosis upon the myocardial contusion. Temporal patterns of Beclin-1 and caspase-3 expression were opposite in rats with high and low stress resistance.

Keywords: myocardial contusion, autophagy, Beclin-1, apoptosis, caspase 3, stress resistance.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

None declared.

◀ English

For citation:

Evgenia I. Klyuchnikova, Olga V. Korpacheva, Sergei I. Mozgovoi, Alexander N. Zolotov, Alexei V. Kononov. Expression of Beclin-1 and caspase-3 after the myocardial contusion in rats with high and low stress resistance. *Fundamental and Clinical Medicine*. (In Russ.). 2024;9(2): 8-19. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2024-9-2-8-19>

*Corresponding author:

Dr. Evgenia I. Klyuchnikova, 12 Lenina Street, Omsk, 644099, Russian Federation, E-mail: kei_omsk@mail.ru
© Evgenia I. Klyuchnikova, et al.

Введение

Поскольку травматическое повреждение является стрессовым воздействием, установлено, что важную роль в патогенезе посттравматического периода ушиба сердца играют стресс-ассоциированные тканевые реакции, такие как аутофагия и апоптоз [2, 3, 4]. Данные феноме-

ны являются вариантами запрограммированной клеточной гибели и участвуют во многих физиологических и патологических процессах организма [5, 6, 7]. Наиболее распространенной формой аутофагии является макроаутофагия (далее – аутофагия). Она представляет собой катаболический механизм поддержания

клеточного гомеостаза и реализуется за счет лизосомальной деградации поврежденных органелл для построения новых функционально полноценных структур либо с целью использования их в качестве альтернативного источника энергии [8]. В свою очередь, суть апоптотических реакций заключается не в обеспечении выживания конкретной клетки, а в сохранении клеточной популяции посредством уничтожения дефектных клеток. Активация каскада сигнальных молекул приводит к распаду клетки-мишени на апоптотические тельца и захвату их фагоцитами без развития воспалительной реакции [9, 10].

Триггерами для развития как аутофагии, так и апоптоза могут становиться: повреждение клеточных органелл, нарушение структуры ДНК, накопление в цитоплазме Ca^{2+} , лактата, денатурировавших белков, а также нехватка субстрата для репаративных и биоэнергетических процессов. При этом есть данные, что для активации каскада апоптотических реакций требуется большее стрессовое воздействие, чем для запуска аутофагии [11].

В выполненных нами ранее исследованиях установлен факт усиления аутофагического потока в миокарде через 24 часа после моделирования ушиба сердца [2]. В других работах описано наличие апоптотических процессов после тупой травмы сердца на сроках 6, 12, 24 часа [3, 4] и 5 суток [5]. Оба феномена изучены и на других экспериментальных моделях: при ишемическом повреждении сердца [12, 13], реперфузии [14, 15], диабетической кардиомиопатии [16]. При этом активация аутофагии происходит на более ранних в сравнении с апоптозом сроках в качестве программы экстренного спасения клетки, после чего, вероятно, неэффективность аутофагии может приводить к развитию апоптоза и гибели клетки [6, 11], однако оценка роли – адаптивной или дезадаптивной – обоих феноменов остается неоднозначной.

В реализации стресс-ассоциированных тканевых реакций, к числу которых относятся аутофагия и апоптоз, существенную роль играет индивидуальная стрессоустойчивость организма [17, 18]. Особенности реализации программы аутофагии в миокарде в зависимости от устойчивости к стрессу были показаны нами через 24 часа посттравматического периода экспериментального ушиба сердца [2]. На основании этого мы предположили, что при тупой травме сердца у животных с разной устойчи-

чивостью к стрессу возможны различные сценарии реализации программ гибели клеток.

Цель исследования

Оценить в динамике посттравматического периода экспериментального ушиба сердца реализацию тканевых реакций аутофагии и апоптоза в условиях высокой и низкой стрессоустойчивости организма.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 106 белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г в соответствии с правилами 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 одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (заключение № 140 от 13.10.2021). На всех инвазивных этапах эксперимента использовали ветеринарный препарат Золетил 100 (тилетамин, золазепам) в дозе 30 мг/кг внутривенно.

С целью разделения животных на группы осуществляли оценку стрессоустойчивости по модифицированной методике ранжирования с последовательным использованием тестов «Открытое поле» и «Принудительное плавание» по Порсолту. Тест «Открытое поле» проводили в течение 3 минут в круглой арене белого цвета, разделенной на 37 секторов. При этом фиксировали такие показатели, как горизонтальная двигательная активность (ГДА), вертикальная двигательная активность (ВДА), латентный период (ЛП) первого движения, время выхода в центр арены, время замираний по ходу движения. Тест принудительного плавания по Порсолту проводили в прозрачном сосуде высотой 80 см, наполненном водой, температура которой составляла $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Критерием оценки стрессоустойчивости являлось время плавания животного. Совместное применение данных тестов обусловлено тем, что они оценивают различные составляющие стрессовой реакции («Открытое поле» – исключительно эмоциональную, принудительное плавание – эмоциональную и физическую) и не заменяют друг друга, а дополняют, позволяя оценивать больший набор характеристик стрессовой реактивности.

Для повышения точности ранжирования животных при проведении теста «Открытое поле» было установлено, что показатель времени выхода в центр арены при дальнейшем анализе оказывает слишком большое влияние на коэффициент стрессоустойчивости, ввиду чего он был заменен на показатель времени замираний по ходу движения, который считается признаком низкой устойчивости к стрессу. Разделение животных на 3 группы по стрессоустойчивости (высоко-, средне-, низкоустойчивые) осуществляли при помощи иерархического кластерного анализа методом внутригрупповой связи. Учитывая неоднородность переменных, была применена стандартизация данных методом z-оценки. При подобной модификации методики ранжирования были выявлены статистически значимые различия ($p < 0,05$) между полученными группами по показателям горизонтальной двигательной активности, вертикальной двигательной активности и времени замирания, а число пересечений в оценке результатов по двум тестам в одной группе получилось близким во всех группах и составило 30–39% [19].

В соответствии с целью эксперимента после тестирования крыс со средним уровнем стрессоустойчивости ($n=42$) исключили из эксперимента. Из оставшихся животных с крайними вариантами устойчивости к стрессу сформировали контрольную (К) и опытную (О) группы ($n=16$ и $n=48$ соответственно). При этом в контрольную группу вошли две подгруппы животных: с высокой (КВ) и низкой (КН) стрессоустойчивостью. В опытную группу вошли шесть подгрупп в соответствии с тремя исследовательскими точками посттравматического периода: с высокой (ОВ-6) и низкой (ОН-6) и стрессоустойчивостью для шестичасового эксперимента, с высокой (ОВ-12) и низкой (ОН-12) стрессоустойчивостью для двенадцатичасового эксперимента, а также с высокой (ОВ-24) и низкой (ОН-24) стрессоустойчивостью для эксперимента длительностью 24 часа. Таким образом сформировали восемь подгрупп по 8 животных в каждой.

У животных опытной группы моделировали ушиб сердца при помощи оригинального устройства, имитирующего удар передней поверхности грудной клетки о стойку руля. Через 6 (для подгрупп ОВ-6 и ОН-6), 12 (для подгрупп ОВ-12 и ОН-12) и 24 (для подгрупп ОВ-24 и ОН-24) часа после моделирования травмы сердца крыс извлекали и изготавливали срезы

толщиной 2–3 мм. Плоскость срезов проходила перпендикулярно оси сердца, проходящей от основания к верхушке. Локализацию повреждения определяли с помощью окраски срезов раствором нитросинего тетразолия [20], после чего из выявленных участков (межжелудочковой перегородки, передних стенок левого и правого желудочков) иссекали фрагменты миокарда размером 5x5 мм. Образцы заливали в парафин и подготавливали для микроскопии по общепринятой методике.

Гистологические срезы изготавливали при помощи микротомы Epradia HM 340E (Epradia, Великобритания), наносили на стекла с адгезивным покрытием, депарафинизировали ксилолом, обрабатывали спиртами нисходящей концентрации. С целью выявления экспрессии проапоптогического белка Beclin-1 проводили иммуногистохимическое исследование с поликлональными кроличьими антителами Anti-Beclin-1, (HUA BIO, Китай), разведение 1:100. Для определения экспрессии проапоптотического белка Caspase 3 осуществляли реакцию с поликлональными кроличьими антителами к маркеру Caspase 3 (Elabscience, Китай), разведение 1:100. Визуализацию результатов иммуногистохимических исследований проводили 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 коричневого окрашивания в цитоплазме кардиомиоцитов. Микроскопию проводили на микроскопе Axioskop 40 (Zeiss, Германия) при 400-кратном увеличении в 10 полях зрения в каждом препарате. Каждое поле зрения фиксировали в виде снимков с помощью камеры AxioCam 503 color (Zeiss, Германия) и графической программы ZenBlue для дальнейшей оценки результатов иммуногистохимического исследования.

Полученные изображения анализировали при помощи полуколичественного метода с учетом двух параметров: интенсивности иммуногистохимической окраски по четырехбалльной шкале (0 – отсутствие окрашивания, 1 – слабая интенсивность окрашивания, 2 – умеренная интенсивность окрашивания, 3 – выраженное окрашивание) и площади окрашивания, выраженную в баллах, соответствующих проценту окрашенных кардиомиоцитов от всех

кардиомиоцитов в поле зрения (0–20% – 1 балл, 21–40% – 2 балла, 41–60% – 3 балла, 61–80% – 4 балла, 81–100% – 5 баллов).

Сумма баллов интенсивности и площади окрашивания кардиомиоцитов в зоне повреждения являлась конечным результатом подсчета для каждого отдельно взятого поля зрения. Далее для всех 10 полей зрения каждого отдельного образца рассчитывали среднее арифметическое значение и индекс экспрессии, после чего производили сравнение показателей, полученных у животных из разных групп и подгрупп. Моделирование ушиба сердца и пробоподготовка проводились на кафедре патофизиологии, иммуногистохимическое исследование – на кафедре патологической анатомии Омского государственного медицинского университета.

Количественные переменные проверяли на нормальность распределения с использованием тестов Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Во всех сравниваемых группах индексы экспрессии Beclin-1 и Caspase 3 имели отличное от нормального распределение, в связи с чем данные обрабатывали непараметрическими методами. Результаты представлены в форма-

те медианы (Me) и межквартильного интервала (Q1-Q3). Для обработки исследовательских групп использовали непараметрический аналог однофакторного дисперсионного анализа ANOVA – критерий Краскела-Уоллиса. После сравнения нескольких групп было проведено апостериорное сравнение post-hoc. Статистическую значимость внутригрупповых различий индексов экспрессии Beclin-1 по отношению к индексам экспрессии Caspase 3 рассчитывали методом рангового дисперсионного анализа Фридмана и конкордации Кендалла. Данные обрабатывали в программе Statistica 10. Статистически значимым считали $p < 0,05$.

Результаты

По данным иммуногистохимического исследования наблюдалось статистически значимое ($p = 0,0008$) увеличение экспрессии проаутофагического белка Beclin-1 в опытной группе по сравнению с контрольной (**рисунок 1**). Между подгруппами контрольной группы различий выявлено не было ($Me_{KB,KH} = 3,0$; $LQ_{KB,KH} = 3,0$; $HQ_{KB,KH} = 3,0$). У животных опытной группы с высокой стрессоустойчивостью отмечалась тенденция к нарастанию индекса экспрессии в динамике посттравматического периода. У низкоустойчивых к стрессу животных опытной группы наблюдалась обратная динамика: постепенное снижение индекса экспрессии в исследовательских точках 6, 12 и 24 часа посттравматического периода (**рисунок 1**).

В миокарде низкоустойчивых к стрессу крыс, сердца которых извлекали через 6 часов после моделирования ушиба сердца, отмечался более высокий уровень индекса экспрессии маркера Beclin-1 ($Me_{OH-6} = 4,33$; $LQ_{OH-6} = 4,0$; $HQ_{OH-6} = 4,33$) в сравнении с высокоустойчивыми особями ($Me_{OB-6} = 3,66$; $LQ_{OB-6} = 3,33$; $HQ_{OB-6} = 3,66$) (**рисунок 1, а**). В подгруппах двенадцатичасового эксперимента экспрессия Beclin-1 не различалась и составляла $Me_{OB-12} = 4,0$; $LQ_{OB-12} = 3,66$; $HQ_{OB-12} = 4,0$ и $Me_{OH-12} = 4,0$; $LQ_{OH-12} = 3,66$; $HQ_{OH-12} = 4,0$ (**рисунок 1, б**), а в подгруппах с длительностью эксперимента 24 часа наблюдалось увеличение экспрессии маркера Beclin-1 у высокоустойчивых к стрессу животных ($Me_{OB-24} = 4,33$; $LQ_{OB-24} = 4,0$; $HQ_{OB-24} = 4,33$) по сравнению с низкоустойчивыми животными ($Me_{OH-24} = 3,66$; $LQ_{OH-24} = 3,66$; $HQ_{OH-24} = 4,0$) (**рисунок 1, с**).

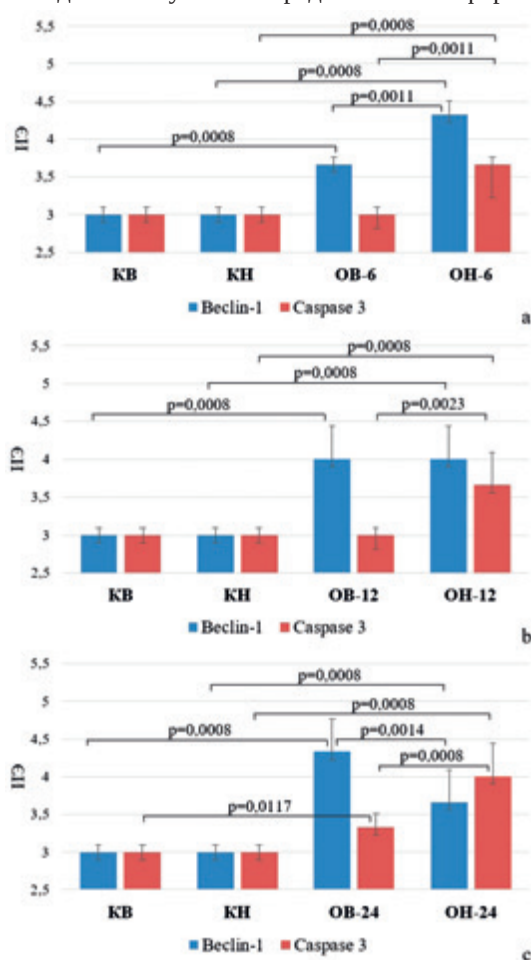
Качественная оценка экспрессии проаутофагического белка Beclin-1 в кардиомиоцитах крыс контрольной группы выявила отсутствие

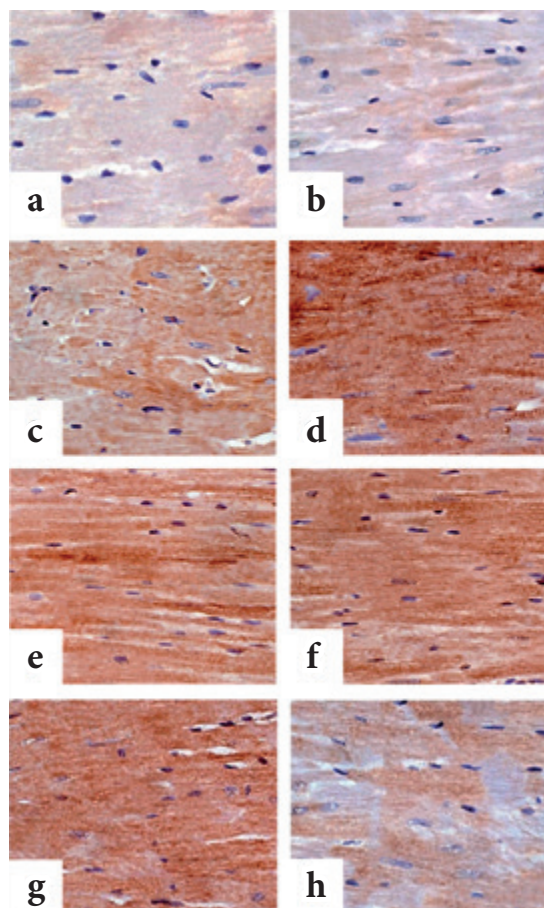
Рисунок 1.

Индексы экспрессии (ИЭ, абс. ед.) Beclin-1 и Caspase 3 в миокарде крыс с высокой (ОВ) и низкой (ОН) стрессоустойчивостью в исследовательских точках 6 (а), 12 (б) и 24 (с) часа посттравматического периода ушиба сердца в сравнении контрольными животными с высокой (КВ) и низкой (КН) стрессоустойчивостью.

Figure 1.

Expression indices (EI, absolute units) of Beclin-1 and Caspase 3 in the myocardium of rats with high (EH) and low (EL) stress resistance at 6 (a), 12 (b) and 24 (c) hours after the myocardial contusion in comparison with control animals with high (CH) and low (CL) stress resistance.



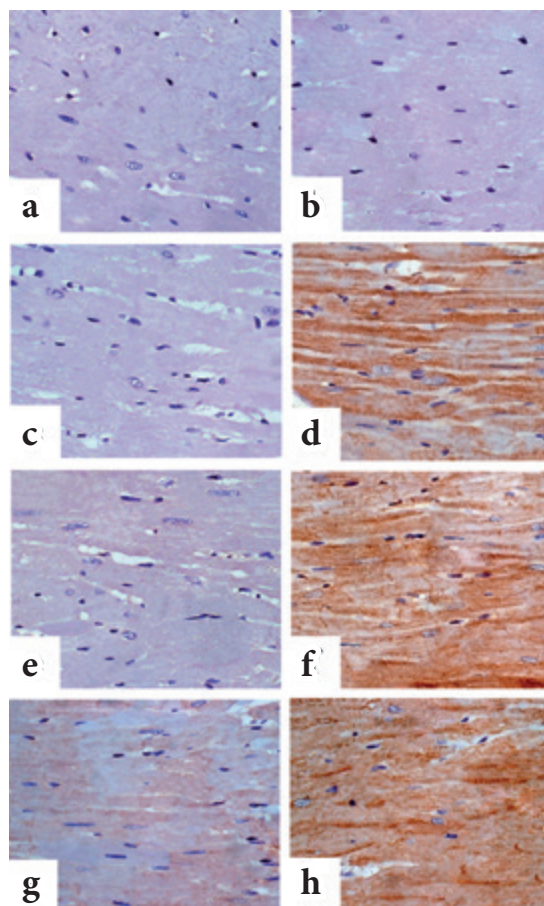
**Рисунок 2.**

Экспрессия белка Beclin-1 в миокарде крыс в посттравматическом периоде экспериментального ушиба сердца. Продольный срез миокарда. Иммуногистохимическое окрашивание, $\times 400$. Примечание. а – подгруппа КВ; б – подгруппа КН; с – подгруппа ОВ-6; д – подгруппа ОН-6; е – подгруппа ОВ-12; ф – подгруппа ОН-12; г – подгруппа ОВ-24; h – подгруппа ОН-24.

Figure 2.

Expression of Beclin-1 after the myocardial contusion. Longitudinal section of the myocardium. Immunohistochemical staining, $\times 400$ magnification. a: control rats with high stress resistance; b: control rats with low stress resistance; c: 6 hours after the myocardial contusion, rats with high stress resistance; d: 6 hours after the myocardial contusion, rats with low stress resistance; e: 12 hours after the myocardial contusion, rats with high stress resistance; f: 12 hours after the myocardial contusion, rats with low stress resistance; g: 24 hours after the myocardial contusion, rats with high stress resistance; h: 24 hours after the myocardial contusion, rats with low stress resistance.

или незначительное цитоплазматическое окрашивание в виде неоднородных вкраплений коричневого цвета низкой интенсивности. Различий между низко- и высокоустойчивыми к стрессу особями контрольной группы (подгруппы КВ и КН) выявлено не было (**рисунок 2, а, б**). Через 6 часов после моделирования ушиба сердца в миокарде высокоустойчивых к стрессу крыс (подгруппа ОВ-6) отмечались отдельные фокусы с низкой и умеренной интенсивностью окрашивания (**рисунок 2, с**). Через 12 и 24 ч (подгруппы ОВ-12 и ОВ-24) иммуногистохимическая реакция представляла собой окрашивание умеренной или высокой интенсивности диффузного характера (**рисунок 2, е, г**). В подгруппе крыс с низкой стрессоустойчивостью и длительностью эксперимента 6 часов (подгруппа ОН-6) отмечалось равномерное цитоплазматическое окрашивание высокой интенсивности во всех полях зрения (**рисунок 2, д**). В подгруппах ОН-12 и ОН-24 наблюдался мозаичный характер окраски высокой и умеренной интенсивности (**рисунок 2, ф, h**). У всех животных после ушиба сердца, вне зависимости от уровня стрессоустойчивости, определялась тенденция к увеличению интенсивности окрашивания и количества положительно окрашенных кардиомиоцитов по направлению к эпикарду в зонах травматического повреждения.

**Рисунок 3.**

Экспрессия белка Caspase 3 в миокарде крыс в посттравматическом периоде экспериментального ушиба сердца. Продольный срез миокарда. Иммуногистохимическое окрашивание, $\times 400$. Примечания. а – подгруппа КВ; б – подгруппа КН; с – подгруппа ОВ-6; д – подгруппа ОН-6; е – подгруппа ОВ-12; ф – подгруппа ОН-12; г – подгруппа ОВ-24; h – подгруппа ОН-24.

Figure 3.

Expression of caspase 3 after the myocardial contusion. Longitudinal section of the myocardium. Immunohistochemical staining, $\times 400$ magnification. a: control rats with high stress resistance; b: control rats with low stress resistance; c: 6 hours after the myocardial contusion, rats with high stress resistance; d: 6 hours after the myocardial contusion, rats with low stress resistance; e: 12 hours after the myocardial contusion, rats with high stress resistance; f: 12 hours after the myocardial contusion, rats with low stress resistance; g: 24 hours after the myocardial contusion, rats with high stress resistance; h: 24 hours after the myocardial contusion, rats with low stress resistance.

При иммуногистохимическом исследовании экспрессии проапоптотического белка Caspase 3 наблюдалось отсутствие маркера в контрольной группе, при этом различий между подгруппами выявлено не было ($Me_{KB,KN} = 3,0$; $LQ_{KB,KN} = 3,0$; $HQ_{KB,KN} = 3,0$). Также отмечалось отсутствие экспрессии маркера в подгруппах крыс с высокой стрессоустойчивостью в исследовательских точках 6 и 12 ч и незначительное увеличение его содержания в цитоплазме кардиомиоцитов в подгруппе с длительностью эксперимента 24 часа. В подгруппах низкоустойчивых к стрессу животных отмечалось постепенное нарастание показателей индекса экспрессии белка Caspase 3 в динамике посттравматического периода (**рисунок 1**).

Через 6 часов после травмы в кардиомиоцитах крыс с низкой стрессоустойчивостью уровень экспрессии проапоптотического белка Caspase 3 был значительно выше ($Me_{OH-6} = 3,66$; $LQ_{OH-6} = 3,66$; $HQ_{OH-6} = 4,0$) уровня экспрессии в подгруппе высокоустойчивых к стрессу особей ($Me_{OB-6} = 3,0$; $LQ_{OB-6} = 3,0$; $HQ_{OB-6} = 3,33$) (**рисунок 1, а**). Аналогичные данные были получены после исследования подгрупп с длительностью эксперимента 12 часов: в подгруппе низкоустойчивых травмированных животных индекс экспрессии составлял $Me_{OH-12} = 3,66$; $LQ_{OH-12} = 3,33$; $HQ_{OH-12} = 3,66$, а в подгруппе высокоустойчивых – $Me_{OB-12} = 3,0$; $LQ_{OB-12} = 3,0$; $HQ_{OB-12} = 3,33$ (**рисунок 1, б**). Через сутки после травмы в миокарде низкоустойчивых к стрессу животных также отмечался более высокий уровень экспрессии маркера ($Me_{OH-24} = 4,0$; $LQ_{OH-24} = 3,66$; $HQ_{OH-24} = 4,0$), чем у высокоустойчивых к стрессу животных ($Me_{OB-24} = 3,33$; $LQ_{OB-24} = 3,0$; $HQ_{OB-24} = 3,33$) (**рисунок 1, с**).

Качественная оценка экспрессии проапоптотического белка Caspase 3 в миокарде животных контрольной группы (подгруппы KB и KN), а также в подгруппах OB-6 и OB-12, показала отсутствие или неравномерное цитоплазматическое окрашивание низкой интенсивности (**рисунок 3, а, б, с, е**). Через 24 часа после травмы в миокарде высокоустойчивых к стрессу животных (OB-24) отмечалась положительная иммуногистохимическая реакция низкой интенсивности диффузного характера (**рисунок 3, г**). В подгруппах крыс с низкой стрессоустойчивостью в исследовательских точках 6 и 12 ч (OH-6 и OH-12) было выявлено равномерное окрашивание цитоплазмы кардиомиоцитов умеренной интенсивности (**рисунок 3, д, ф**), а в группе с длитель-

ностью эксперимента 24 часа наблюдалась высокая интенсивность окраски (**рисунок 3, h**).

Обсуждение

По данным иммуногистохимического исследования была выявлена экспрессия проаутофагического белка Beclin-1 в миокарде после моделирования ушиба сердца, причем индекс экспрессии в подгруппах высокоустойчивых и низкоустойчивых к стрессу животных различался в разные сроки посттравматического периода. Содержание проапоптотического белка Caspase 3 в цитоплазме кардиомиоцитов после тупой травмы сердца также было повышено в сравнении с группой контроля, при этом индекс экспрессии у животных с низкой стрессоустойчивостью был выше, чем у высокоустойчивых к стрессу особей во всех исследовательских точках.

Проаутофагический белок Beclin-1 входит в состав фосфатидилинозитол-3-киназных комплексов класса III C1 и C2 (Phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K Class III C1 и C2), являясь их центральным каркасным компонентом и обеспечивая интеграцию сигналов для регуляции клеточного гомеостаза. При фосфорилировании PI3K Class III C1 продуцируется фосфатидилинозитол-3-фосфат (Phosphatidylinositol 3-phosphate, PtdIns3P), который посредством рекрутирования генов DFCP1 и WIPI запускает отделение изолирующей мембраны от эндоплазматического ретикулума для последующего формирования аутофагосомы. В свою очередь, PI3K Class III C2 участвует в процессе аутофагии на более поздних этапах, когда происходит слияние аутофагосомы и лизосомы [6, 21]. К факторам, которые могут способствовать запуску аутофагии посредством воздействия на внутриклеточные регуляторные комплексы mTOR (Mammalian target of rapamycin) и AMPK (Adenosinemonophosphate-activated protein kinase), относятся увеличение концентрации в цитоплазме активированных форм кислорода (АФК), Ca^{2+} , денатурировавших белков, а также гипоксия и уменьшение синтеза АТФ как следствие повреждения клеточных органелл [22]. Увеличение экспрессии белка Beclin-1 в опытной группе прямо свидетельствует об усилении аутофагического потока в кардиомиоцитах в посттравматическом периоде экспериментального ушиба сердца и косвенно – об участии перечисленных факторов в запуске данной тканевой реакции в условиях повреждения.

Проапоптотический белок каспаза 3 представляет собой протеолитический фермент, который в исходном виде синтезируется как неактивный стабильный димер прокаспазы 3. При активации внутреннего (митохондриального) пути апоптоза происходит нарушение баланса антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического белка BAX на мембране митохондрий, что приводит к повышению ее проницаемости, утечке цитохрома С в цитоплазму и формированию апоптосомы, обеспечивающей димеризацию инициаторной каспазы 9, которая в итоге расщепляет прокаспазу 3 и переводит ее в активное состояние. Внешний путь апоптоза осуществляется через взаимодействие лигандов (FasL, TNF- α , TRAIL) с рецепторами смерти на клеточной мембране (Fas, TNF-R1, DR4, DR5), что приводит к рекрутированию адаптерных молекул (FADD, TRADD) и активации инициаторной каспазы 8, которая напрямую преобразует прокаспазу 3 в каспазу 3. Активированная эффекторная каспаза 3, являясь ключевым медиатором апоптоза, расщепляет ингибитор ДНК-азы и способствует фрагментации клеточной ДНК, после чего происходит формирование апоптотических телец и их утилизация фагоцитами. Инициация апоптоза может произойти из-за значительного стрессового воздействия на клетку вследствие гипоксии, энергодифицита, увеличения концентрации АФК и внутриклеточного Ca^{2+} , накопления поврежденных органелл и др. [23, 24]. Экспрессия белка Caspase 3 в кардиомиоцитах после моделирования ушиба сердца прямо свидетельствует об активации в миокарде апоптотических реакций в посттравматическом периоде и косвенно – об участии перечисленных факторов в запуске этой тканевой реакции в условиях повреждения.

Индекс экспрессии проаутофагического белка Beclin-1 у высокоустойчивых к стрессу крыс в динамике посттравматического периода экспериментального ушиба сердца постепенно увеличивается через 6, 12 и 24 часа после травмы, тогда как повышение экспрессии маркера апоптоза Caspase 3 наблюдается у данных особей только на сроке 24 часа (рисунки 4, а). Вероятно, преобладание процессов аутофагии над апоптозом у животных с высокой стрессоустойчивостью связано с относительно небольшой выраженностью воздействующих на клетку стрессовых факторов и, как следствие, не критическим повреждением кардиомиоцитов,

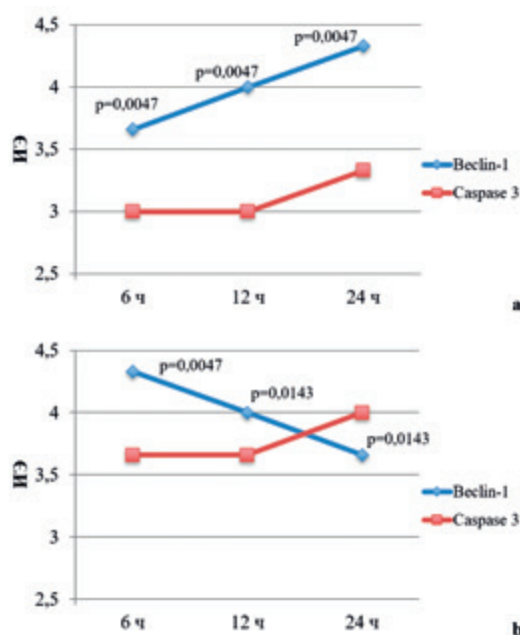


Рисунок 4. Индексы экспрессии (ИЭ, абс. ед.) проаутофагического белка Beclin-1 и проапоптотического белка Caspase 3 в миокарде высокоустойчивых (а) и низкоустойчивых (б) к стрессу крыс в посттравматическом периоде ушиба сердца. Статистическая значимость различий индексов экспрессии Beclin-1 по отношению к индексам экспрессии Caspase 3 выражена в абсолютных значениях p , рассчитанных методом рангового дисперсионного анализа Фридмана и конкордации Кендалла.

Figure 4. Expression indexes (EI, absolute units) of the pro-autophagic protein Beclin-1 and the pro-apoptotic protein Caspase 3 in the myocardium of highly (a) and low (b) stress-resistant rats in the post-traumatic period of cardiac contusion. The statistical significance of differences in Beclin-1 expression indices relative to Caspase 3 expression indices is expressed in absolute p values calculated by Friedman rank analysis of variance and Kendall concordance.

при котором аутофагия протекает эффективно и не приводит к запуску апоптоза, а низкий уровень активности каспазы в клетках, подвергающихся умеренному стрессу, может обеспечить им защиту от гибели [25].

Постепенное снижение экспрессии маркера Beclin-1 у низкоустойчивых к стрессу животных опытной группы в исследовательских точках 6, 12, 24 часа с одновременным нарастанием экспрессии маркера Caspase 3 и перекрестом кривых, отражающих их экспрессию, на сроке между 12 и 24 часами (рисунки 4, б) может свидетельствовать о смене аутофагических процессов на апоптотические в динамике посттравматического периода. Этот факт, вероятно, объясняется тем, что одинаковое по силе механическое воздействие вызывает у особей с низкой стрессоустойчивостью более значимое повреждение миокарда и способствует более выраженному клеточному стрессу, при котором реакции аутофагии становятся неэффективными и происходит запуск сигнального каскада апоптоза. Исходя из того, что феномены аутофагии и апоптоза являются стресс-ассоциированными тканевыми реакциями, можно полагать, что стрессоустойчивость организма влияет на выбор оптимальной программы клеточной гибели в условиях повреждения.

Вероятные сценарии активации сигнальных путей аутофагии и апоптоза в условиях экспериментального ушиба сердца у животных с различной устойчивостью к стрессу представлены на рисунке 5. Аутофагия и апоптоз вы-

зываются одними и теми же факторами/стимулами, однако при умеренном стрессовом воздействии запускается аутофагия, а при выраженном и продолжительном стрессе аутофагические реакции ингибируются различными клеточными механизмами, что в итоге приводит к активации апоптоза [10, 11]. Одним из таких механизмов является расщепление каспазами белка Beclin-1 на фрагменты, не обладающие аутофагической активностью, а образующийся при этом С-концевой фрагмент Beclin-1 способен усиливать высвобождение цитохрома С из митохондрий, обеспечивая петлю обратной положительной связи для апоптоза [6, 21]. Стоит отметить, что белок апоптоза BAX, локализующийся на митохондриальной мембране, облегчает расщепление Beclin-1 каспазами по Asp149, тем самым подавляя аутофагию [22]. Антиапоптотический белок Bcl-2 также способен угнетать аутофагические процессы, связываясь с Beclin-1 и нарушая образование им комплексов с Vps-34 и PI3K Class III C1 и C2 (рисунок 5). Однако данные о том, индуцирует ли ассоциация Bcl-2 и Beclin-1 апоптоз через снижение антиапоптотической активности Bcl-2, до сих пор остаются неоднозначными [25].

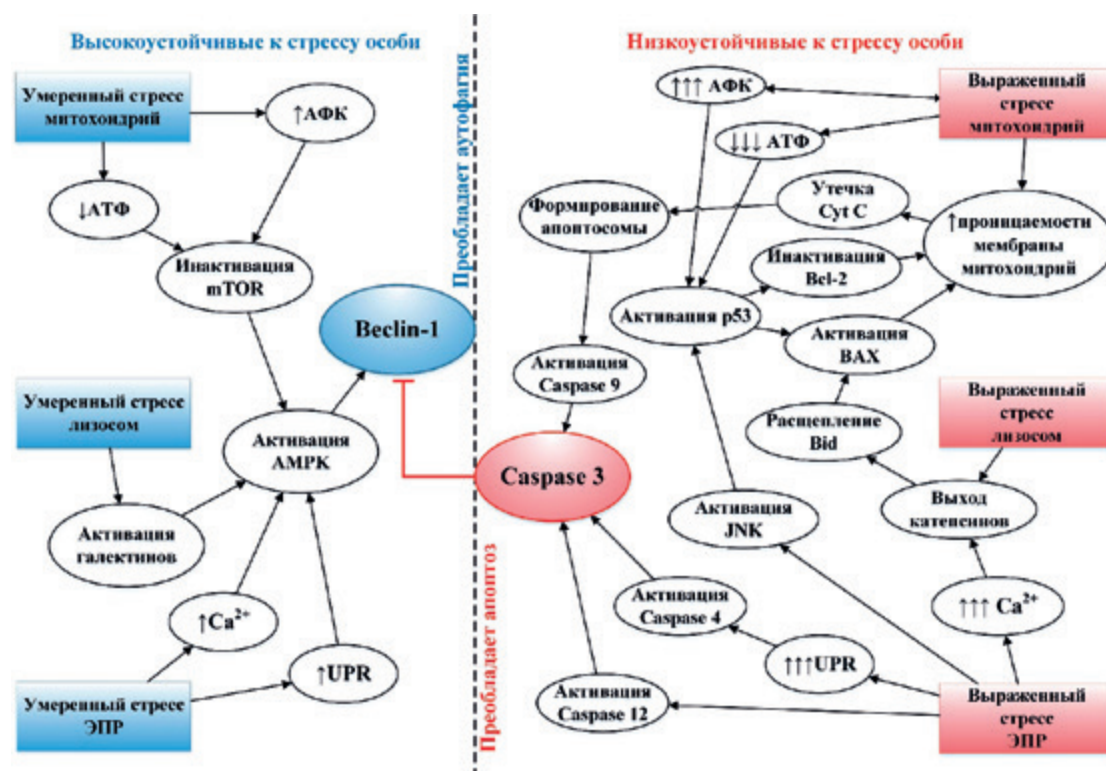
Кроме того, сигнальный путь JNK, активирующийся вследствие выраженного клеточного стресса, способствует фосфорилированию Bcl-2, что вызывает диссоциацию комплекса Bcl-2

и Beclin-1 и усиливает аутофагию, однако одновременно с этим JNK увеличивает активность проапоптотического белка BAX, проницаемость митохондриальной мембраны и выход цитохрома С в цитоплазму, обеспечивая индукцию апоптоза по внутреннему пути. JNK может запускать апоптоз и по внешнему пути, увеличивая взаимодействие между рецептором смерти Fas и FasL, опосредуя активацию инициаторной каспазы 8, а затем основной эффекторной каспазы 3 [26]. Более того, переключению клетки на программу апоптоза при выраженном повреждении ее компонентов могут способствовать: выход в цитоплазму катепсинов при повышении проницаемости лизосомальных мембран или при нарушении их целостности [27], активация каспазы 4 [28] и каспазы 12 из-за выраженного стресса эндоплазматического ретикула [29], которые также являются активаторами каспазы 3 (рисунок 5).

Таким образом, преобладание экспрессии проаутофагического белка Beclin-1 над экспрессией проапоптотического белка Caspase 3 у высокоустойчивых к стрессу животных во всех исследовательских точках посттравматического периода ушиба сердца (подгруппы ОВ-6, ОВ-12, ОВ-24) может свидетельствовать о менее выраженном структурном повреждении кардиомиоцитов и, как следствие, об оптимальной реализации каскада реакций аутофагии при

Рисунок 5. Предполагаемые механизмы реализации феноменов аутофагии и апоптоза в миокарде крыс с высокой и низкой устойчивостью к стрессу через 24 часа после экспериментального ушиба сердца. Рисунок авторов. Пояснения в тексте.

Figure 5. Involvement of autophagy and apoptosis in the myocardium of rats with high and low stress resistance 24 hours after the myocardial contusion. Рисунок авторов. Пояснения в тексте.



одновременном ингибировании апоптотических процессов, что может обеспечить выживаемость клеток посредством эффективной репарации. Постепенное снижение индекса экспрессии маркера Beclin-1 и нарастание индекса экспрессии маркера Caspase 3, вероятно, отражает превышение определенной степени повреждения клеток у травмированных особей с низкой стрессоустойчивостью (подгруппы ОН-6, ОН-12, ОН-24), что обуславливает запуск механизмов ингибирования аутофагии и активации сигнальных путей апоптоза.

Заключение

В зонах повреждения миокарда после экспериментального ушиба сердца происходит активация феномена аутофагии и запуск апоптотических процессов вне зависимости от стрессоустойчивости животных, что подтверждается наличием экспрессии соответствующих маркеров: маркеров Beclin-1 и Caspase 3. Однако выраженность и динамика экспрессии этих маркеров различается у животных с высокой и низкой устойчивостью к стрессу.

Так, показатель экспрессии Beclin-1 в миокарде животных с высокой стрессоустойчивостью в динамике посттравматического периода очевидно нарастает, что свидетельствует об увеличении аутофагического потока, а у особей с низкой устойчивостью к стрессу, напро-

тив, отмечается снижение уровней индекса экспрессии.

Направленность миокардиальной экспрессии проапоптотического белка Caspase 3 в динамике посттравматического периода ушиба сердца не различается у животных с высокой и низкой стрессоустойчивостью: и у высоко-, и у низкоустойчивых к стрессу крыс экспрессия маркера увеличивается в динамике, однако в подгруппах животных с высокой стрессоустойчивостью исходные показатели индекса экспрессии ниже, чем в подгруппах животных с низкой устойчивостью к стрессу.

Полученные данные позволяют предположить, что аутофагия как тканевая реакция адаптации проявляется при менее тяжелом повреждении миокарда в условиях тупой травмы сердца, что наблюдается у животных с высокой стрессоустойчивостью. При несостоятельности этого феномена у низкоустойчивых к стрессу особей и более тяжелом повреждении миокарда адаптивная роль аутофагии минимизируется и доминирующей тканевой реакцией становится апоптоз. Для окончательного вывода о роли – адаптивной или дезадаптивной – названных феноменов необходимо сопоставление приведенных в публикации результатов с полученными нами данными о сократительной функции сердца в динамике посттравматического ушиба сердца у животных с различной устойчивостью к стрессу.

Литература :

1. Weber B., Lackner I., Gebhard F., Miclau T., Kalbitz M. Trauma, a Matter of the Heart-Molecular Mechanism of Post-Traumatic Cardiac Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(2):737. <https://doi.org/10.3390/ijms22020737>
2. Ключникова Е.И., Корпачева О.В., Мозговой С.И., Золотов А.Н., Кононов А.В. 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>
3. Tao L., Liu H.R., Gao F., Qu Y., Christopher T.A., Lopez B.L., Ma X.L. Mechanical traumatic injury without circulatory shock causes cardiomyocyte apoptosis: role of reactive nitrogen and reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005;288(6):2811-2818. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01252.2004>
4. Yan Z., He J.L., Guo L., Zhang H.J., Zhang S.L., Zhang J., Wen Y.J., Cao C.Z., Wang J., Wang J., Zhang M.S., Liang F. Activation of caspase-12 at early stage contributes to cardiomyocyte apoptosis in trauma-induced secondary cardiac injury. *Sheng Li Xue Bao*. 2017;69(4):367-377
5. 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;12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187270>
6. Gordy C., He Y.W. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? *Protein Cell*. 2012;3(1):17-27. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1127-x>
7. D'Arcy M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 2019;43(6):582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
8. Prerna K., Dubey V.K. Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: New understanding. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022;204:258-273. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.005>
9. Zhao G.X., Pan H., Ouyang D.Y., He X.H. The critical molecular interconnections in regulating apoptosis and autophagy. *Ann. Med.* 2015;47(4):305-315. <https://doi.org/10.3109/07853890.2015.1040831>
10. 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. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2004-4>
11. Sukumaran P., Nascimento Da Conceicao V., Sun Y., Ahamad N., Saraviva L.R., Selvaraj S., Singh B.B. Calcium Signaling Regulates Autophagy and Apoptosis. *Cells*. 2021;10(8):2125. <https://doi.org/10.3390/cells10082125>
12. Takagi H., Matsui Y., Hirotani S., Sakoda H., Asano T., Sadoshima J. AMPK mediates autophagy during myocardial ischemia in vivo. *Autophagy*. 2007;3(4):405-407. <https://doi.org/10.4161/auto.4281>
13. Liu Q. Lentivirus mediated interference of Caspase-3 expression ameliorates the heart function on rats with acute myocardial infarction. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2014;18(13):1852-1858.
14. Condorelli G., Roncarati R., Ross J. Jr., Pisani A., Stassi G., Todaro M., Trocha S., Drusco A., Gu Y., Russo M.A., Frati G., Jones S.P., Lefer D.J., Napoli C., Croce C.M. Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*. 2001;98(17):9977-9982. <https://doi.org/10.1073/pnas.161120198>

15. Matsui Y., Takagi H., Qu X., Abdellatif M., Sakoda H., Asano T., Levine B., Sadoshima J. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ. Res.* 2007;100(6):914-922. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000261924.76669.36>
16. He C., Zhu H., Li H., Zou M.H., Xie Z. Dissociation of Bcl-2-Beclin1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes. *Diabetes* 2013;62(4):1270-1281. <https://doi.org/10.2337/db12-0533>
17. Кузнецов А.И., Васильева Т.А. Влияние тонуса симпатoadrenalовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы на функцию кроветворных органов у собак с разной стрессовой чувствительностью. *Известия ОГАУ.* 2019;79(5):185-188.
18. Chrishtop V.V., Tomilova I.K., Rumyantseva T.A., Mikhaylenko E.V., Avila-Rodriguez M.F., Mikhaleva L.M., Nikolenko V.N., Somasundaram S.G., Kirkland C.E., Bachurin S.O., Aliev G. The Effect of Short-Term Physical Activity on the Oxidative Stress in Rats with Different Stress Resistance Profiles in Cerebral Hypoperfusion. *Mol. Neurobiol.* 2020;57(7):3014-3026. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01930-5>
19. 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. <https://doi.org/10.17513/spno.31965>
20. Ключникова Е.И., Золотов А.Н., Корпачева О.В., Мозговой С.И., Храмых Т.П., Ермолаев П.А. Способ макроскопической паноптической визуализации очагов повреждения и расчета объема поврежденного миокарда при моделировании ушиба сердца. Патент РФ на изобретение №2799815 12.07.2023. Бюл. № 20. Доступно по: <https://patentimages.storage.googleapis.com/c5/8d/a5/4b6bcd854efa54/RU2799815C1.pdf>. Ссылка активна на 17.04.2024.
21. Tran S., Fairlie W.D., Lee E.F. BECLIN1: Protein Structure, Function and Regulation. *Cells.* 2021;10(6):1522. <https://doi.org/10.3390/cells10061522>
22. Maejima Y., Isobe M., Sadoshima J. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;95:19-25. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.10>
23. Asadi M., Taghizadeh S., Kaviani E., Vakili O., Taheri-Anganeh M., Tahamtan M., Savardashtaki A. Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2022;69(4):1633-1645. <https://doi.org/10.1002/bab.2233>
24. Eskandari E., Eaves C.J. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *J. Cell. Biol.* 2022;221(6):e202201159. <https://doi.org/10.1083/jcb.202201159>
25. Booth L.A., Tavallai S., Hamed H.A., Cruickshanks N., Dent P. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Cell. Signal.* 2014;26(3):549-555. <https://doi.org/10.1016/j.cell-sig.2013.11.028>
26. Sui X., Kong N., Ye L., Han W., Zhou J., Zhang Q., He C., Pan H. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett.* 2014;344(2):174-179. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.11.019>
27. Zhang Z., Pi R., Jiang Y., Ahmad M., Luo H., Luo J., Yang J., Sun B. Cathepsin B mediates the lysosomal-mitochondrial apoptosis pathway in arsenic-induced microglial cell injury. *Hum. Exp. Toxicol.* 2023;42:9603271231172724. <https://doi.org/10.1177/09603271231172724>
28. Kim S.J., Zhang Z., Hitomi E., Lee Y.C., Mukherjee A.B. Endoplasmic reticulum stress-induced caspase-4 activation mediates apoptosis and neurodegeneration in INCL. *Hum. Mol. Genet.* 2006;15(11):1826-1834. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl105>
29. Liu H., Wang Z., Nowicki M.J. Caspase-12 mediates carbon tetrachloride-induced hepatocyte apoptosis in mice. *World J. Gastroenterol.* 2014;20(48):18189-18198. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i48.18189>

References:

1. Weber B, Lackner I, Gebhard F, Miclau T, Kalbitz M. Trauma, a Matter of the Heart-Molecular Mechanism of Post-Traumatic Cardiac Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):737. <https://doi.org/10.3390/ijms22020737>
2. Klyuchnikova EI, Korpacheva OV, Mozgovoy SI, Zolotov AN, Kononov AV. Influence of Stress Resistance on Myocardial Expression of the Pro-Autophagic Protein Beclin-1 After Cardiac Contusion in Experimental Setting. *General Reanimatology.* 2023;19(6):54-61. (In Russ.). <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2023-6-54-61>
3. Tao L, Liu HR, Gao F, Qu Y, Christopher TA, Lopez BL, Ma XL. Mechanical traumatic injury without circulatory shock causes cardiomyocyte apoptosis: role of reactive nitrogen and reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(6):2811-2818. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01252.2004>
4. Yan Z, He JL, Guo L, Zhang HJ, Zhang SL, Zhang J, Wen YJ, Cao CZ, Wang J, Wang J, Zhang MS, Liang F. Activation of caspase-12 at early stage contributes to cardiomyocyte apoptosis in trauma-induced secondary cardiac injury. *Sheng Li Xue Bao.* 2017;69(4):367-377.
5. Kalbitz M, Amann EM, 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;12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187270>
6. Gordy C, He YW. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? *Protein Cell.* 2012;3(1):17-27. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1127-x>
7. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019;43(6):582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
8. Prema K, Dubey VK. Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: New understanding. *Int J Biol Macromol.* 2022;204:258-273. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.005>
9. Zhao GX, Pan H, Ouyang DY, He XH. The critical molecular interconnections in regulating apoptosis and autophagy. *Ann Med.* 2015;47(4):305-15. <https://doi.org/10.3109/07853890.2015.1040831>
10. 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. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2004-4>
11. Sukumaran P, Nascimento Da Conceicao V, Sun Y, Ahamad N, Saraiva LR, Selvaraj S, Singh BB. Calcium Signaling Regulates Autophagy and Apoptosis. *Cells.* 2021;10(8):2125. <https://doi.org/10.3390/cells10082125>
12. Takagi H, Matsui Y, Hirotsu S, Sakoda H, Asano T, Sadoshima J. AMPK mediates autophagy during myocardial ischemia in vivo. *Autophagy.* 2007;3(4):405-407. <https://doi.org/10.4161/auto.4281>
13. Liu Q. Lentivirus mediated interference of Caspase-3 expression ameliorates the heart function on rats with acute myocardial infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(13):1852-1858.
14. Condorelli G, Roncarati R, Ross J Jr, Pisani A, Stassi G, Todaro M, Trocha S, Drusco A, Gu Y, Russo MA, Frati G, Jones SP, Lefer DJ, Napoli C, Croce CM. Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(17):9977-9982. <https://doi.org/10.1073/pnas.161120198>
15. Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, Levine B, Sadoshima J. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res.* 2007;100(6):914-922. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000261924.76669.36>
16. He C, Zhu H, Li H, Zou MH, Xie Z. Dissociation of Bcl-2-Beclin1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes. *Diabetes.* 2013;62(4):1270-1281. <https://doi.org/10.2337/db12-0533>
17. Kuznetsov AI, Vasilyeva TA. 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.).
18. Chrishtop VV, Tomilova IK, Rumyantseva TA, Mikhaylenko EV, Avila-Rodriguez MF, Mikhaleva LM, Nikolenko VN, Somasundaram SG, Kirkland CE, Bachurin SO, Aliev G. The Effect of Short-Term Physical Activity on the Oxidative Stress in Rats with Different Stress Resistance Profiles in Cerebral Hypoperfusion. *Mol Neurobiol.* 2020;57(7):3014-3026. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01930-5>
19. Priymak AB, Korpacheva OV, Zolotov AN, Klyuchnikova EI. Method of ranking rats by stress resistance and determination of the sample volume in experimental heart injury. *Modern problems of science and education.* 2022;4:120. (In Russ.). <https://doi.org/10.17513/spno.31965>
20. Klyuchnikova EI, Zolotov AN, Korpacheva OV, Mozgovoy SI, Khramykh

- TP, Ermolaev PA. Method of macroscopic panoptic visualization of lesions and calculation of the volume of damaged myocardium when modeling a heart contusion. Patent of invention RUS №2799815 12.07.2023. Bull. №20. (In Russ.). Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/c5/8d/a5/4b6bcd854efa54/RU2799815C1.pdf>. Accessed: 22.04.2024.
21. Tran S, Fairlie WD, Lee EF. BECLIN1: Protein Structure, Function and Regulation. *Cells*. 2021;10(6):1522. <https://doi.org/10.3390/cells10061522>
22. Maejima Y, Isobe M, Sadoshima J. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;95:19-25. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015>.
23. Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, Vakili O, Taheri-Anganeh M, Tahamtan M, Savardashtaki A. Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnol Appl Biochem*. 2022;69(4):1633-1645. <https://doi.org/10.1002/bab.2233>
24. Eskandari E, Eaves CJ. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *J Cell Biol*. 2022;221(6). <https://doi.org/10.1083/jcb.202201159>
25. Booth LA, Tavallai S, Hamed HA, Cruickshanks N, Dent P. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Cell Signal*. 2014;26(3):549-555. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.028>
26. Sui X, Kong N, Ye L, Han W, Zhou J, Zhang Q, He C, Pan H. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett*. 2014;344(2):174-179. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.11.019>
27. Zhang Z, Pi R, Jiang Y, Ahmad M, Luo H, Luo J, Yang J, Sun B. Cathepsin B mediates the lysosomal-mitochondrial apoptosis pathway in arsenic-induced microglial cell injury. *Hum Exp Toxicol*. 2023;42:9603271231172724. <https://doi.org/10.1177/09603271231172724>
28. Kim SJ, Zhang Z, Hitomi E, Lee YC, Mukherjee AB. Endoplasmic reticulum stress-induced caspase-4 activation mediates apoptosis and neurodegeneration in INCL. *Hum Mol Genet*. 2006;15(11):1826-1834. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl105>
29. Liu H, Wang Z, Nowicki MJ. Caspase-12 mediates carbon tetrachloride-induced hepatocyte apoptosis in mice. *World J Gastroenterol*. 2014;20(48):18189-18198. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i48.18189>

Сведения об авторах

Ключникова Евгения Игоревна, аспирант кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12).
Вклад в статью: проведение эксперимента, статистическая обработка, написание статьи.
ORCID: 0000-0003-4606-3173

Корпачева Ольга Валентиновна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12).

Вклад в статью: статистическая обработка, написание, редакция статьи.
ORCID: 0000-0001-6110-3933

Мозговой Сергей Игоревич, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12).

Вклад в статью: проведение иммуногистохимического исследования, статистическая обработка, редакция статьи.
ORCID: 0000-0001-7200-7082

Золотов Александр Николаевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12).

Вклад в статью: проведение эксперимента, написание статьи.
ORCID: 0000-0002-6775-323X

Кононов Алексей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12).

Вклад в статью: редакция статьи.
ORCID: 0000-0001-8607-7831

Authors

Dr. Evgenia I. Klyuchnikova, MD, PhD Student, Department of Pathophysiology, Omsk State Medical University (12, Lenina Street, Omsk, 644099, Russian Federation).

Contribution: conducted the experiments, performed the data analysis; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0003-4606-3173

Prof. Olga V. Korpacheva, MD, DSc, Head of the Department of Pathophysiology, Omsk State Medical University (12, Lenina Street, Omsk, 644099, Russian Federation).

Contribution: performed the data analysis; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-6110-3933

Prof. Sergei I. Mozgovoi, MD, DSc, Professor, Department of Pathological Anatomy, Omsk State Medical University (12, Lenina Street, Omsk, 644099, Russian Federation).

Contribution: conducted the experiments, performed the data analysis; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-7200-7082

Dr. Alexander N. Zolotov, MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathophysiology, Omsk State Medical University (12, Lenina Street, Omsk, 644099, Russian Federation).

Contribution: conducted the experiments; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-6775-323X

Prof. Alexei V. Kononov, MD, DSc, Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Head of the Department of Pathological Anatomy, Omsk State Medical University (12, Lenina Street, Omsk, 644099, Russian Federation).

Contribution: wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-8607-7831

Статья поступила: 20.03.2024 г.

Поступила после доработки: 01.05.2024 г.

Принята в печать: 30.05.2024 г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Received: 20.03.2024

Received in revised form: 01.05.2024

Accepted: 30.05.2024

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.