

РОЛЬ АПОПТОЗА ПРИ ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ АДГЕЗИОГЕНЕЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭМПИЕМЕ ПЛЕВРЫ

Калашникова С.А., Айдаева С.Ш., Калашникова Е.А., Полякова Л.В., Филиппова В.П.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Пятигорск, e-mail: ajdaeva-salihat@yandex.ru

Целью настоящей работы явилось определение эффективности биологической стимуляции адгезиогенеза на фоне хронической эмпиемы плевры при оценке иммуногистохимических маркеров апоптоза и клеточной пролиферации. Установлено, что в группах с применением жировой ткани и сочетанного применения плазмы, обогащенной тромбоцитами, и жировой взвеси наблюдается раннее созревание соединительной ткани, о чем свидетельствуют высокие показатели иммунопозитивных клеток к каспазе-3 и активной каспазе-3 на фоне снижения транскрипционного фактора NF-kbp65 уже на 20-е сутки эксперимента. В то время как в группах контроля и при использовании плазмы, обогащенной тромбоцитами, на этом сроке наблюдается сохранение воспалительной реакции и высокие показатели иммунопозитивных клеток к транскрипционному фактору, что говорит о нарушении процессов созревания в фазу репаративных изменений при хронической эмпиеме плевры. При этом внутривнутриплевральные сращения, формирующиеся на фоне биологической стимуляции адгезиогенеза путем сочетанного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами и жировой взвеси, подвергаются частичной редукции за счет активации механизма апоптоза, о чем свидетельствует снижение экспрессии маркеров апоптоза и NF-kbp65 к концу эксперимента.

Ключевые слова: хроническая эмпиема плевры, спайкообразование, остаточная плевральная полость, апоптоз, каспаза-3, активная каспаза-3, транскрипционный фактор (NF-kbp65).

THE ROLE OF APOPTOSIS IN EVALUATING THE EFFECTIVENESS OF BIOLOGICAL STIMULATION OF ADHESION IN CHRONIC PLEURAL EMPYEMA

Kalashnikova S.A., Aidaeva S.Sh., Kalashnikova E.A., Polyakova L.V., Filippova V.P.

Pyatigorsk Medicak and Pharmaceuticak Institute-branch of FSBEI of HE VolgGMU of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, e-mail: ajdaeva-salihat@yandex.ru

The purpose of this work was to determine the effectiveness of biological stimulation of adhesion against the background of chronic pleural empyema in the assessment of immunohistochemical markers of apoptosis and cell proliferation. It was found that in groups with the use of adipose tissue and combined use of platelet-rich plasma and fat suspension, early maturation of connective tissue is observed, as evidenced by high rates of immunopositive cells to caspase-3 and active caspase-3 against the background of a decrease in the transcription factor NF-kb p65 already on the 20th day of the experiment. While in the control groups and when using plasma enriched with platelets, at this time there is a preservation of the inflammatory response and high rates of immune-positive cells to the transcription factor, which indicates a violation of the maturation processes in the phase of reparative changes in chronic pleural empyema. In this case, intrapleural splices formed against the background of biological stimulation of adhesion by combined administration of platelet-rich plasma and fat suspension are partially reduced due to activation of the apoptosis mechanism, as evidenced by a decrease in the expression of apoptosis markers and NF-kb p65 by the end of the experiment.

Keywords: chronic pleuralempyema, adhesiogenesis, residualpleuralcavity, apoptosis, caspase-3, active caspase-3, transcription factor (NF-kbp65).

При оценке физиологического гомеостаза соединительной ткани большое значение имеют процессы клеточной пролиферации и апоптоз. Известно, что пролиферация является разрешающей стадией воспалительного процесса, обеспечивающей устранение очага экссудации. В свою очередь апоптоз является основным механизмом устранения клеток на разных стадиях заживления, а также препятствует чрезмерному фиброзу за счет устранения клеток воспалительного ряда, которые имеют стимулирующее воздействие на фибробласты

через продукцию интерлейкинов [1; 2].

Известно, что транскрипционный фактор роста NF- κ B является одним из главных факторов регуляции клеточной пролиферации и апоптоза. При активации ядерного транскрипционного фактора происходит индукция противоапоптотических механизмов с сохранением воспалительной реакции. Ингибирование апоптоза может привести к избыточному росту соединительной ткани при спайкообразовании за счет сохранения клеточной популяции в очаге воспаления [3; 4]. Таким образом, оценка экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации играет большую роль в оценке эффективности применения биологических субстратов для стимуляции адгезиогенеза и устранения остаточной полости при эмпиеме плевры [5; 6].

Цель исследования: определить эффективность биологической стимуляции адгезиогенеза при хронической эмпиеме плевры при оценке иммуногистохимических маркеров апоптоза и клеточной пролиферации.

Материал и методы исследования. Экспериментальное исследование проведено на 450 нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180-210 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Протокол эксперимента составлен в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), приказами МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» и МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г., а также на основе принципов биоэтики и правил лабораторной практики (GLP). Использование экспериментальных животных признано необходимым, допускается и регламентируется ст. 25 и 26 «Европейской конвенции о защите позвоночных животных».

На первом этапе эксперимента была смоделирована хроническая эмпиема плевры с формированием остаточной плевральной полости путем введения 1 млрд взвеси E.coli в V межреберье по подмышечной линии в течение 28 дней [7]. На втором этапе животные были разделены на 5 экспериментальных групп по 90 особей в каждой с последующей стимуляцией адгезиогенеза различными биологическими субстратами. В I группе (негативный контроль) в плевральную полость вводили 1,0 мл физиологического раствора. Во II группе (позитивный контроль) для стимуляции адгезиогенеза вводили 1,0 мл 1%-ного раствора доксицилина внутривнеплеврально. Животным III опытной группы вводили плазму, обогащенную тромбоцитами (набор для забора крови Plasmolifting™, ООО «Плазмолифтинг», г. Казань, Россия. ТУ 9437-002-27837594-2015, регистрационное удостоверение № РЗН 2016/3980 от 19.04.2016) [8; 9], в IV опытной группе применяли

аутологичную жировую взвесь (липофилинг), в V опытной группе использовался метод сочетанного потенцирования адгезиогенеза путем введения плазмы, обогащенной тромбоцитами, и аутологичной жировой ткани [10].

Выведение животных осуществляли на 10, 20 и 30 сут. от начала второго этапа эксперимента по 30 особей каждой группы. Иммуногистохимическое исследование проводили непрямым пероксидазным методом. Реакцию проводили с использованием поликлональных кроличьих антител Anti-NF-kB p65 antibody (Abcam, Англия), Anti Caspase-3 antibody (Abcam, Англия) и Anti-aktive Caspase-3 antibody (Abcam, Англия). Исследование микропрепаратов осуществляли с использованием микроскопа «LeicaDM 100» (Leica Mikrosystems GmbH, Германия) с цифровой фотокамерой. Выраженность экспрессии оценивали с помощью программы LAS Version 4.2.7 с последующим морфометрическим исследованием степени экспрессии иммунопозитивного материала.

Статистическая обработка проведена общепринятыми для медико-биологического исследования методами с использованием программных пакетов Excel 7.0 (Microsoft, USA). Нормальность распределения полученных результатов проверяли с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. После этого проводилась оценка достоверности данных, подчиняющихся нормальному распределению, с помощью параметрического t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что на 10-е сутки эксперимента в I группе (НК) и во II группе (ПК) происходит утолщение висцеральной плеврой за счет миграции фибробластов и образования незрелой соединительной ткани. При иммуногистохимическом исследовании к каспазе-3 отмечались единичные иммунопозитивные клетки ($5,69 \pm 0,8\%$ и $5,52 \pm 0,4\%$ соответственно, $p < 0,05$). При оценке иммунореактивности тканей плевральной полости к активной каспазе-3 было установлено, что ОД иммунопозитивных клеток была несколько выше, чем в случае использования каспазы-3 (НК $-6,46 \pm 1,2\%$, ПК $-6,98 \pm 1,9\%$, $p < 0,05$). При анализе результатов иммуногистохимического исследования с использованием антител к NF-kB достоверных отличий ОД иммунопозитивных клеток в группах контроля обнаружено не было: НК $-26,86 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$), в ПК $-25,15 \pm 1,2\%$.

При стимуляции адгезиогенеза в III опытной группе (PRP) иммунопозитивные клетки к каспазе-3 ($6,39 \pm 1,9\%$, $p < 0,05$) и активной каспазе-3 ($7,83 \pm 0,5\%$, $p < 0,05$) располагались со стороны висцеральной плеврой, где в области прикрепления спайки находились коллагеновые и ретикулярные волокна незрелой соединительной ткани. Кроме этого, на данном сроке эксперимента происходило незначительное уменьшение экспрессии ядерного фактора NF-kB, что составило $28,72 \pm 0,8\%$ ($p < 0,05$). Такое изменение объясняется

увеличением миграции фибробластов в очаг воспаления и началом формирования сосудов соединительной ткани.

В IV опытной группе процентное соотношение иммунопозитивных клеток к каспазе-3 и активной каспазе-3 было выше, чем в контрольных группах, и составило $6,39 \pm 1,9\%$ и $9,49 \pm 2,9\%$ соответственно ($p < 0,05$). В то же время наблюдается экспрессия иммунопозитивных клеток к NF-kB - $33,01 \pm 1,4\%$ ($p < 0,05$), что объясняется сохранением лимфо-лейкоцитарного инфильтрата и образованием структурных компонентов спайки.

В V опытной группе экспрессия иммунопозитивных клеток к каспазе-3 и активной каспазе-3 представлена единичными положительно окрашенными клетками на фоне снижения воспалительной реакции и формирования незрелой соединительной ткани, среди которой выявлялись жировые клетки, ОД которых была достоверно выше показателей в группе НК и ПК ($9,51 \pm 2,7\%$ и $10,47 \pm 1,2\%$ соответственно, $p < 0,05$). Единичные иммунопозитивные клетки к NF-kB располагались диффузно по всему полю зрения среди волокон соединительной ткани и составили $35,22 \pm 0,8\%$ ($p < 0,05$). Процентное содержание иммунопозитивных клеток к маркерам апоптоза и пролиферации при хронической эмпиеме плевры на 10-е сутки представлено на рисунке 1.

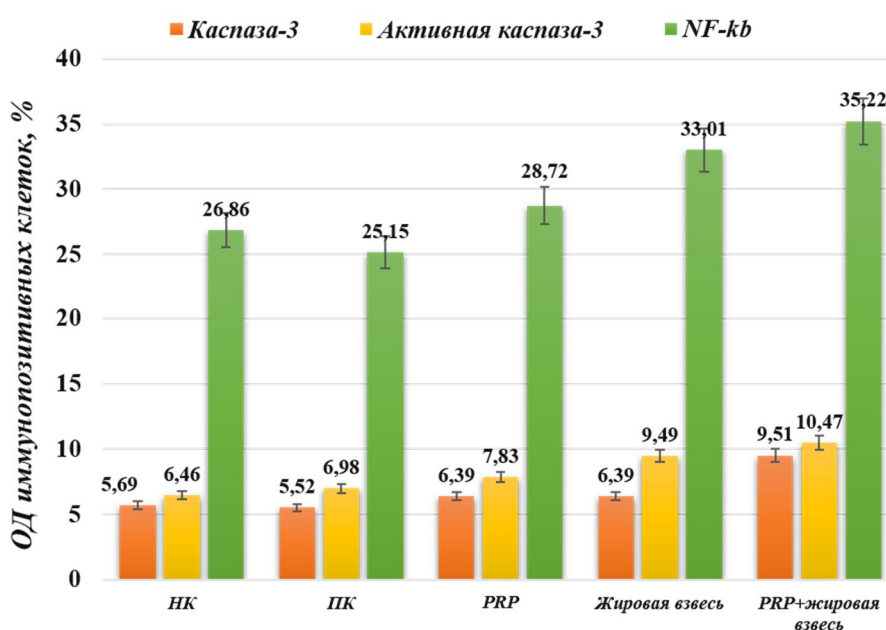


Рис. 1. Сравнительная характеристика экспрессии каспазы-3, активной каспазы-3 и NF-kb в экспериментальных группах при хронической эмпиеме плевры на 10-е сут., $p < 0,05$

На 20-е сут. эксперимента в группе без лечения среди рыхло расположенных волокон наблюдалось наличие единичных иммунопозитивных клеток к каспазе-3 ($7,01 \pm 1,8\%$) и активной каспазе-3 ($8,63 \pm 0,5\%$), что свидетельствовало о нарушении процессов

адгезиогенеза с преобладанием явлений экссудативного воспаления: отека, лимфоцитарной и нейтрофильной инфильтрации. Экспрессия NF-kB, напротив, была повышена ($27,13 \pm 1,3\%$, $p < 0,05$).

Во II группе на этом сроке процессы адгезиогенеза характеризовались увеличением числа коллагеновых волокон с преобладанием фибробластов в составе спаек, где определялись иммунопозитивные клетки к каспазе-3 (ОД - $11,01 \pm 1,1\%$) и к активной каспазе-3 (ОД - $13,9 \pm 0,5\%$). Сохранение признаков воспалительной реакции, наряду с образованием волокон соединительной ткани фибробластами, сопровождалось экспрессией NF-kB с распределением иммунопозитивных клеток по всему полю зрения, что составило $23,38 \pm 0,3\%$ ($p < 0,05$).

В III опытной группе на этом сроке ОД иммунопозитивных клеток к каспазе-3 ($10,38 \pm 0,9\%$, $p < 0,05$) и активной каспазе-3 ($11,78 \pm 0,8\%$, $p < 0,05$) не имела достоверных отличий от показателей группы НК. На фоне незначительной экспрессии каспаз в соединительной ткани наблюдалось обилие иммунопозитивных клеток к NF-kB, которые располагались во всех структурных элементах спайки, где ОД составила $24,09 \pm 1,6\%$ ($p < 0,05$).

В IV опытной группе отмечалось увеличение ОД иммунопозитивных клеток к каспазе-3 до $23,22 \pm 3,1\%$ ($p < 0,05$) за счет структурной перестройки спайки, а также увеличение экспрессии активной каспазы-3 в 4,1 раза по сравнению с 10 сут. ($39,72 \pm 2,9\%$, $p < 0,05$), что объяснялось изменением клеточного каркаса спайки. При этом наблюдалось заметное снижение ОД иммунопозитивных клеток к NF-kB ($12,76 \pm 1,1\%$), что подтверждает наличие апоптоза в спайках на этом сроке.

В V опытной группе на этом сроке наблюдалось два основных компонента ткани, которые давали иммунопозитивное окрашивание: фибробласты и клетки воспалительного ряда. ОД иммунопозитивных клеток к каспазе-3 увеличилась в 5 раз, а к активной каспазе-3 в 5,5 раза по сравнению с группой НК, что составило $35,16 \pm 1,3\%$ и $53,83 \pm 0,5\%$ соответственно ($p < 0,05$), что подтверждало процесс раннего созревания спайки в группе с сочетанным потенцированием адгезиогенеза. Параллельно с этим происходило снижение экспрессии NF-kB до $11,37 \pm 1,5\%$ ($p < 0,05$) с расположением позитивных клеток среди волокон соединительной ткани.

На рисунке 2 представлена сравнительная характеристика показателей ОД иммунопозитивных клеток к каспазе-3, активной каспазе-3 и NF-kB в группах с хронической эмпиемой плевры на 20-е сут. эксперимента.

На 30-е сут. эксперимента в I группе экспрессия каспазы-3 была незначительной с ОД $15,95 \pm 2,9\%$ ($p < 0,05$), в то время как по экспрессии активной каспазы-3 было установлено, что

ОД иммунопозитивных клеток была в 3,7 раза выше аналогичных показателей на 10-е сут. эксперимента и составила $21,43 \pm 1,8\%$ ($p < 0,05$). При этом определялась экспрессия NF-kB ($16,24 \pm 1,6\%$, $p < 0,05$), что свидетельствовало о недостаточности апоптотических факторов и сохранении воспаления.

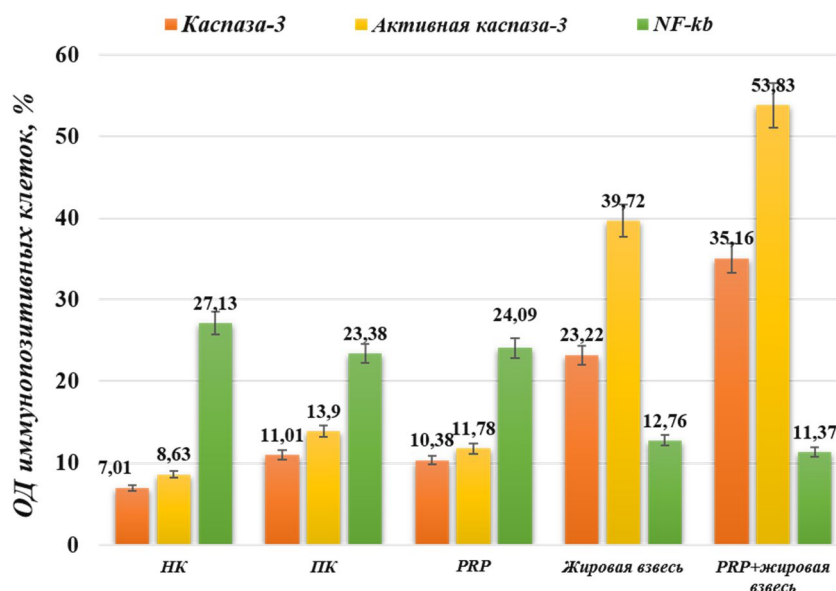


Рис. 2. Сравнительная характеристика экспрессии каспазы-3, активной каспазы-3 и NF-kb в экспериментальных группах при хронической эмпиеме плевры на 20-е сут., $p < 0,05$

Во II группе ОД иммунопозитивных клеток к каспазе-3 составила $19,57 \pm 2,5\%$ ($p < 0,05$). При этом ОД иммунопозитивных клеток к активной каспазе-3 была несколько выше и составила $37,74 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$), что было в 1,5 раза выше аналогичных показателей группы НК. Параллельно с этим отмечалось снижение экспрессии NF-kB, процентное содержание которого было значительно ниже, чем на 10-е и 20-е сут., и составляло $15,02 \pm 1,4\%$ ($p < 0,05$).

В III опытной группе на 30-е сут. эксперимента отмечалось наиболее высокое количество иммунопозитивных клеток к каспазе-3, где ОД была $23,69 \pm 1,1\%$ ($p < 0,05$), по сравнению с другими сроками эксперимента этой же экспериментальной модели. Как и ОД иммунопозитивных клеток к активной каспазе-3 ($31,30 \pm 0,3\%$, $p < 0,05$), что связано с созревaniem спаек и их структурной перестройкой. Также наблюдалось снижение ОД иммунопозитивных клеток к NF-kB ($14,37 \pm 1,5\%$, $p < 0,05$), что имеет обратную корреляционную зависимость от экспрессии каспазы-3.

В IV и V опытных группах на этом сроке наблюдается снижение иммунопозитивных клеток к маркерам апоптоза (рис. 3). Так, при использовании жировой ткани ОД позитивно окрашенных клеток к каспазе-3 составила $12,27 \pm 3,2\%$, а при сочетанном потенцировании

адгезиогенеза - $11,21 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$). Од к активной каспазе-3 составила $18,27 \pm 2,1\%$ и $13,91 \pm 0,9\%$ соответственно, что достоверно отличалось от показателей I группы и III опытной группы на данном сроке. К тому же наличие незначительного числа иммунопозитивных клеток к NF-kB в этих группах (IV группа - $9,18 \pm 0,8\%$, V группа - $7,02 \pm 1,2\%$) свидетельствует о достаточно высокой степени зрелости соединительной ткани с устранением воспалительных элементов путем апоптоза и достаточным числом фибробластов, синтезирующих внеклеточный матрикс, представленный преимущественно коллагеновыми волокнами.

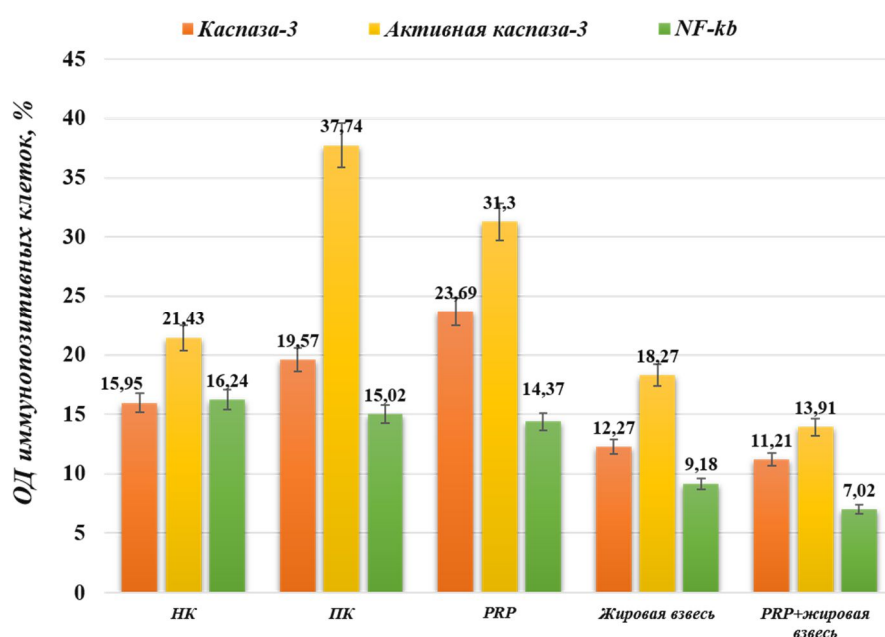


Рис. 3. Сравнительная характеристика экспрессии каспазы-3, активной каспазы-3 и NF-kb в экспериментальных группах при хронической эмпиеме плевры на 30-е сут., $p < 0,05$

Выводы

1. При анализе экспрессии иммуногистохимических маркеров апоптоза на 10-е сут. эксперимента степень экспрессии каспазы-3 возрастает в ряду: НК → ПК → PRP-технологии → жировая взвесь → сочетанное потенцирование адгезиогенеза.

2. Максимальное количество иммунопозитивных клеток к каспазе-3 и активной каспазе-3 на 20-е сут. эксперимента определяется в группах с использованием аутологичной жировой взвеси и сочетанного потенцирования адгезиогенеза, в то время как в группах НК, ПК и с использованием PRP-технологии экспрессия была незначительной, что свидетельствовало о замедлении процессов адгезиогенеза с сохранением сосудов, воспалительного инфильтрата и недостаточной продукции соединительнотканых элементов спайки.

3. На 30-е сут. эксперимента в группах с использованием жировой взвеси и при сочетанном потенцировании адгезиогенеза, экспрессия маркеров апоптоза была минимальной, что свидетельствовало об утрате транзиторных клеток соединительной ткани, связанных с развитием воспаления, уменьшением ОД сосудов и числа функционально активных фибробластов. Данный факт подтверждает завершение адгезиогенеза к 30-м суткам и свидетельствует о формировании спаек в стадии зрелых сращений.

4. При сопоставлении результатов экспрессии каспаз и NF-κB выявлена обратная зависимость от экспрессии маркеров апоптоза. Так, максимальные значения в группах НК, ПК и с использованием PRP-технологии наблюдались на 30-е сут., в то время как в группах с использованием жировой взвеси и при сочетанном потенцировании адгезиогенеза - на 20-е сут. эксперимента, что говорит о нарушении процессов созревания в фазу репаративных изменений при хронической эмпиеме плевры.

Список литературы

1. Копейна Г.С., Замаев А.В., Животовский Б.Д., Лаврик И.Н. Программируемый некроз и регенерация тканей // *Гены & Клетки*. 2018. Т. 13, № 2. С. 35-38. DOI: 10.23868/201808017.
2. Zhung-Han W., Jie-Heng T., Cheng-Ying H., Wei-Lin C., Chi-Li C. Endothelin-1 Induces Mesothelial Mesenchymal Transition and Correlates with Pleural Fibrosis in Tuberculous Pleural Effusions. *J. Clin. Med.* 2019. Vol. 8, no.4. P. 426. DOI: 10.3390/jcm8040426.
3. Гунин А.Г., Голубцова Н.Н. Трансформирующий фактор роста-в (TGF-в) в коже человека в процессе старения // *Успехи геронтологии*. 2019. №1-2. С.12-19.
4. Singh R., Letai A., Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019. vol. 20. P. 175–193. DOI: 10.1038/s41580-018-0089-8.
5. Rathore R., McCallum J.E., Varghese E., Florea A-M., Büsselberg D. Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). *Apoptosis* 2017. no.22. P. 898–919. DOI: 10.1007/s10495-017-1375-1.
6. Воробьев А.А., Калашников А.В., Салимов Д.Ш. Патологические проявления внутриплевральной адгезии // *Современная наука и инновации*. 2017. №1 (17). С. 228-236.
7. Калашников А.В., Калашникова С.А., Айдаева С.Ш. Способ моделирования остаточных плевральных полостей // *Рационализаторское предложение №6 от 22.01.2018 г.*
8. Yun Q., Qixin H., Wei Ch., Jialin S., Xiaotian Z., Yuanming O., Weien Y., Cunyi F. Platelet-Rich Plasma derived growth factors contribute to stem cell differentiation in

musculoskeletal regeneration. *Frontiers in Chemistry*. 2017. vol. 5. P. 89. DOI: 10.3389/fchem.2017.00089.

9. Карагadyн А.Д. применение аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами, в дерматокосметологии (обзор) // *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2017. № 6. С. 368-372.

10. Xiong B.J., Tan Q.W., Chen Y.J., Zhang Y., Zhang D., Tang S.L., Zhang S., Lv Q. The Effects of Platelet-Rich Plasma and Adipose-Derived Stem Cells on Neovascularization and Fat Graft Survival. *Aesthetic Plastic Surgery*. 2018. Vol. 42, № 1. P. 1-8. DOI: 10.1007/s00266-017-1062-1.