

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ОЦЕНКЕ ВЫРАЖЕННОСТИ АДГЕЗИОГЕНЕЗА В ПЛЕВРАЛЬНОЙ ПОЛОСТИ ПРИ БИОЛОГИЧЕСКОМ ПОТЕНЦИРОВАНИИ

Калашникова С.А.¹, Айдаева С.Ш.¹, Полякова Л.В.¹, Калашникова Е.А.¹, Филиппова В.П.¹

¹ *Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Пятигорск, e-mail: ajdaeva-salihat@yandex.ru*

Целью данной работы стало определение выраженности адгезиогенеза и эффективности биологической потенции с использованием иммуногистохимических маркеров к транскрипционному фактору (NF-κB p65) и фактору роста фибробластов (FGF-1). В ходе исследования было установлено, что в группе с изолированным использованием плазмы, обогащенной тромбоцитами, экспрессия FGF-1 возрастала к 30 сут. на фоне высоких показателей иммунопозитивных клеток к ядерному фактору NF-κB, что свидетельствовало о неконтролируемом спайкообразовании и могло привести к тотальному заращению плевральной полости. В то время как в группе с использованием аутологичной жировой ткани и сочетанного применения жировой ткани и плазмы, обогащенной тромбоцитами, формирование соединительной ткани на 20-е сут. эксперимента сопровождалось экспрессией FGF-1 и снижением ОД иммунопозитивных клеток к транскрипционному фактору. При этом в группе с сочетанным потенцированием адгезиогенеза на 30-е сут. зафиксированы единичные позитивно окрашенные клетки к обоим маркерам, что указывало на высокую степень зрелости соединительной ткани с устранением воспалительных элементов и подтверждало безопасность применения данного способа для стимулирования адгезиогенеза при хронической эмпиеме плевры.

Ключевые слова: хроническая эмпиема плевры, спайкообразование, остаточная плевральная полость, пролиферация, фактор роста фибробластов 1 (FGF-1), транскрипционный фактор (NF-κB p65).

USE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS IN ASSESSING THE SEVERITY OF ADHESION IN THE PLEURAL CAVITY DURING BIOLOGICAL POTENTIATION

Kalashnikova S.A.¹, Aidaeva S.Sh.¹, Polyakova L.V.¹, Kalashnikova E.A.¹, Filippova V.P.¹

¹ *Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute-branch of FSBEI of HE VolgGMU of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, e-mail: ajdaeva-salihat@yandex.ru*

The aim of this work was to determine the severity of adhesion and the effectiveness of biological potentiation using immunohistochemical markers to transcription factor (NF-κB p65) and fibroblast growth factor (FGF-1). The study found that in the group with isolated platelet-rich plasma, FGF-1 expression increased by 30 days against the background of high rates of immunopositive cells to the nuclear factor NF-κB, which indicated uncontrolled spike formation and could lead to total growth of the pleural cavity. While in the group using autologous adipose tissue and combined use of adipose tissue and platelet-rich plasma, the formation of connective tissue on 20 days of the experiment was accompanied by FGF-1 expression and a decrease in the RESISTANCE of immunopositive cells to the transcription factor. At the same time, in the group with combined potentiation of adhesion, single positively colored cells were recorded for 30 days to both markers, which indicated a high degree of connective tissue maturity with the elimination of inflammatory elements and confirmed the safety of using this method to stimulate adhesion in chronic pleural empyema.

Keywords: chronic pleural empyema, adhesiogenesis, residual pleural cavity, proliferation, fibroblast growth factor 1 (FGF-1), transcription factor (NF-κB p65).

При изучении адгезиогенеза важную роль играет синтетическая активность фибробластов, которые участвуют в синтезе компонентов межклеточного матрикса и формировании грануляционной ткани при разрешении воспалительного процесса [1]. При хронической эмпиеме плевры стадия фиброзной организации напрямую зависит от

фибробластов, которые пролиферируют и проникают в плевральную жидкость как из висцеральной, так и париетальной плевры, образуя соединительную ткань [2]. За счет формирования грануляционной ткани листки плевры утолщаются, делая их менее подвижными. При длительном воспалении происходит усиление фиброза с ограничением дыхательной экскурсии легкого [3; 4]. Поэтому разрешение воспалительного процесса в плевральной полости зависит не только от подавления воспалительного ответа, но и ингибирования пролиферации фибробластов и синтеза коллагена [5; 6].

Известно, что пролиферативная, миграционная способность и синтетическая активность фибробластов напрямую зависит от клеточного микроокружения. На функциональную активность фибробластов могут влиять другие клетки, в особенности при воспалительном процессе [7; 8]. В то время как за клеточную пролиферацию и регуляцию апоптотических процессов отвечает ядерный транскрипционный фактор NF- κ B. После его активации происходит блокирование апоптоза, что продлевает жизнь в клетках-эффекторах в очаге воспаления. Следовательно, период воспалительной реакции увеличивается, что может стать причиной формирования фиброза и устойчивости фибробластов к апоптозу [9]. Таким образом, для оценки выраженности адгезиогенеза в плевральной полости и определения эффективности использования различных биологических субстратов при хронической эмпиеме плевры могут быть использованы иммуногистохимические маркеры, такие как NF- κ B и FGF-1.

Цель исследования – оценить выраженность адгезиогенеза в плевральной полости при биологическом потенцировании адгезиогенеза с помощью иммуногистохимических маркеров (NF- κ B p65, FGF-1).

Материал и методы исследования. Исследование проведено на 450 нелинейных половозрелых крысах-самцах. Все животные содержались в стандартных условиях вивария Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России согласно с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Эксперимент составлен в соответствии с приказами МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» и МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), придерживаясь 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».

Эксперимент проводили в два этапа. Для начала всем животным внутриплеврально в V межреберье по подмышечной линии вводили 1 млрд взвеси *E. coli* в течение 28 дней для

моделирования хронической эмпиемы плевры и образования ригидной плевральной полости [10]. Затем все животные были разделены по 90 особей на пять экспериментальных групп, две из которых были группами контроля и три опытные группы с использованием методов биологического стимулирования адгезиогенеза. Животным I группы (негативный контроль, НК) лечение не проводилось – внутривнутриплеврально вводили 1,0 мл физиологического раствора, а животным II группы (позитивный контроль, ПК) - 1,0 мл 1% раствора доксициклина. Использование плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRP), в качестве адгезива применяли в III опытной группе (набор для забора крови Plasmolifting™, ООО «Плазмолифтинг», г. Казань, Россия. ТУ 9437-002-27837594-2015, регистрационное удостоверение № РЗН 2016/3980 от 19.04.2016). В IV опытной группе с той же целью использовали аутологичную жировую взвесь (липофилинг), а в V опытной группе применяли метод сочетанного потенцирования адгезиогенеза с использованием обоих биологических субстратов. На 10, 20 и 30-е сут. от начала второго этапа животные выводились из эксперимента по 30 особей из каждой группы.

Для иммуногистохимического исследования, которое проводили непрямым пероксидазным методом, использовали поликлональные кроличьи антитела - Anti-NF-kB p65 antibody (Abcam, Англия), Anti-FGF-1 antibody (Abcam, Англия). Микрофотографии полученных микропрепаратов были сделаны с использованием микроскопа LeicaDM 100 с цифровой фотокамерой. Морфометрическое исследование с дальнейшей оценкой экспрессии иммунопозитивного материала проводили с помощью программы LAS Version 4.2.7. Для статистической обработки полученных данных использовали программные пакеты Excel 7.0 (Microsoft, USA). Для анализа вида распределения полученных результатов использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Достоверность данных с нормальным распределением оценивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При иммуногистохимическом исследовании образцов животных I группы установлено, что на 10-е сут. эксперимента происходит утолщение плевры, преимущественно висцеральной, за счет миграции фибробластов и формирования тонких волокон соединительной ткани. При этом объемная доля (ОД) иммунопозитивных клеток к ядерному фактору NF-kB составила $26,86 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$). Однако при оценке экспрессии фактора роста фибробластов (FGF-1) были выявлены единичные иммунопозитивные клетки, ОД которых составила $8,16 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$).

При анализе иммунореактивности тканей плевральной полости к NF-kB и FGF-1 во II группе достоверных отличий от группы НК выявлено не было. В процентном соотношении ОД иммунопозитивных клеток составила $25,15 \pm 1,2\%$ и $9,28 \pm 1,2\%$ соответственно ($p < 0,05$).

В III опытной группе, где для стимуляции адгезиогенеза использовалась плазма, обогащенная тромбоцитами, на данном сроке наблюдалось увеличение миграции фибробластов с образованием сосудов незрелой соединительной ткани. ОД иммунопозитивных клеток к NF-kB составила $28,72 \pm 0,8\%$ ($p < 0,05$). Неоангиогенез и синтез внеклеточного матрикса формирующихся спаек плевральной полости сопровождался наличием иммунопозитивных клеток к FGF-1 ($10,92 \pm 1,5\%$, $p < 0,05$), которые были представлены макрофагами, отдельными фибробластами, а также клетками сосудистой стенки. В свою очередь это приводило к стимуляции фибробластов и увеличению их синтетической функции.

В то же время в IV опытной группе высокая экспрессия ядерного фактора NF-kB свидетельствовала о сохранении клеточного инфильтрата и формировании каркаса спайки. Процентное соотношение транскрипционного фактора составило $33,01 \pm 1,4\%$ ($p < 0,05$), что в 1,2 раза было больше, чем в группе НК. В данной группе адгезиогенез сопровождался экспрессией FGF-1, где иммунопозитивные клетки составляли значительную часть структурных элементов спайки и располагались не только со стороны париетальной и висцеральной плевры, но и собственно незрелой соединительной ткани. ОД позитивно окрашенных клеток составила $12,83 \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$), что было достоверно больше, чем в группах контроля.

Диффузное расположение позитивно окрашенных клеток к NF-kB определялось в V опытной группе, что составило $35,22 \pm 0,8\%$ ($p < 0,05$). На данном сроке эксперимента клеточный состав спайки свидетельствовал об активации синтетической функции фибробластов, что подтверждается экспрессией FGF-1. Так, иммунопозитивное окрашивание клеток к FGF-1 наблюдалось как в месте формирования коллагеновых волокон, так и вокруг разнокалиберных сосудов, что подтверждает фазу раннего созревания соединительной ткани. Со стороны ОД позитивных клеток ($16,31 \pm 0,8\%$) были выявлены достоверные отличия от показателей группы НК и ПК ($p < 0,05$), рис. 1.

На 20-е сут. эксперимента в группе НК экспрессия NF-kB была повышена, где позитивное окрашивание имело значительное число клеточных элементов, формирующих сращения в плевральной полости, что связано, по-видимому, с выраженной воспалительной реакцией. В данном случае ОД иммунопозитивных клеток составила $27,13 \pm 1,3\%$ ($p < 0,05$). На данном сроке эксперимента среди волокон незрелой соединительной ткани определялись иммунопозитивные клетки к FGF-1, ОД которых составила $11,52 \pm 0,4\%$ ($p < 0,05$).

При этом в группе ПК с использованием доксициклина экспрессия транскрипционного фактора сопровождалась сохранением признаков воспаления и формированием волокон соединительной ткани, что составило $23,38 \pm 0,3\%$ ($p < 0,05$). При этом иммунопозитивные клетки большей частью определялись вокруг сосудов соединительной ткани. Экспрессия FGF-1 в клетках соединительной ткани распределялась неравномерно с преобладанием иммунопозитивных клеток вокруг сосудов, а также среди волокон соединительной ткани собственно спайки. Определение ОД иммунопозитивных клеток к FGF-1 выявило, что она была достоверно выше ($18,21 \pm 0,8\%$) по сравнению с группой НК ($p < 0,05$).

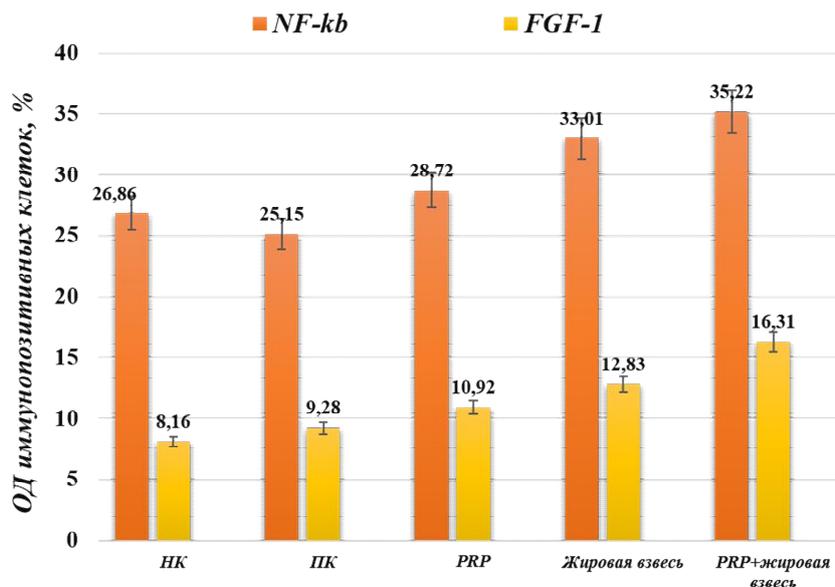


Рис. 1. Хроническая эмпиема плевры. 10-е сутки эксперимента.
Показатели экспрессии NF-kb и FGF-1, $p < 0,05$

В III опытной группе ОД позитивно окрашенные клетки против NF-kB, расположенных непосредственно в самой спайке, составила $24,09 \pm 1,6\%$ ($p < 0,05$). Наряду с этим в данной группе наблюдалось увеличение числа иммунопозитивных клеток к FGF-1, что сопровождалось формированием волокон соединительной ткани и новообразованием сосудов различного диаметра. Однако процентное содержание позитивно окрашенных клеток было незначительно выше, чем в ПК на этом сроке, что составило $19,85 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$).

В то же время в IV опытной группе на этом сроке наблюдалось достоверное снижение ОД иммунопозитивного материала к NF-kB ($12,76 \pm 1,1\%$). При оценке экспрессии FGF-1 в соединительной ткани было установлено, что возрастала ОД позитивно окрашенных клеток, которая составила $32,12 \pm 0,8\%$, что в 3,9 раза больше показателей группы НК и ПК ($p < 0,05$).

Аналогичное снижение экспрессии NF-kB наблюдалось и в группе с сочетанным потенцированием адгезиогенеза ($11,37 \pm 1,5\%$, $p < 0,05$). При этом позитивно окрашенные

клетки располагались среди волокон соединительной ткани, что свидетельствовало о сохранении воспалительной реакции наряду с пролиферацией фибробластов и созреванием спайки. Установлено, что количество иммунопозитивных клеток к FGF-1 было максимальным по сравнению с другими сроками эксперимента ($37,02 \pm 1,5\%$, $p < 0,05$), что свидетельствовало об активном адгезиогенезе и формировании сращений в плевральной полости. На рисунке 2 представлена сравнительная характеристика процентного содержания иммунопозитивных клеток к NF-kB и FGF-1 на 20-е сут. хронической эмпиемы плевры.

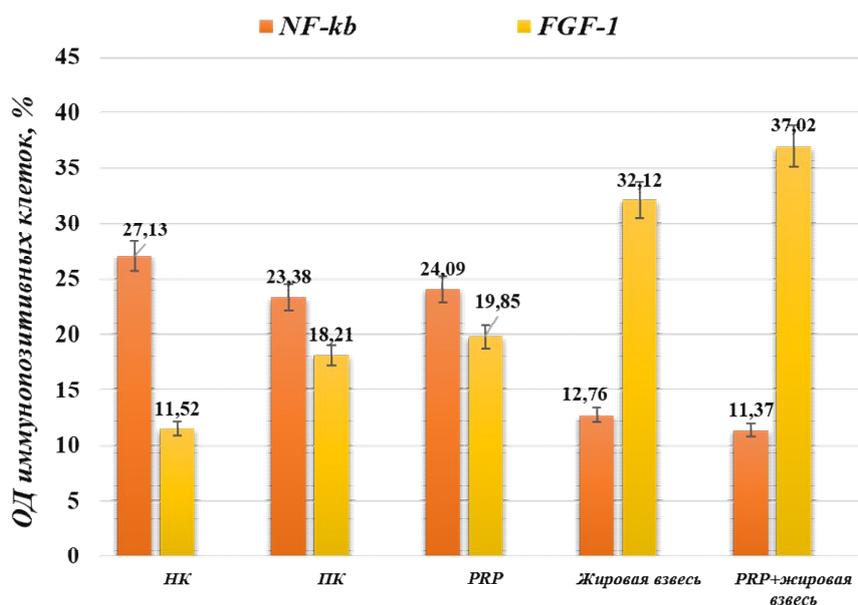


Рис. 2. Хроническая эмпиема плевры. 20-е сутки эксперимента.
Показатели экспрессии NF-kB и FGF-1, $p < 0,05$

К концу эксперимента в группе НК ОД иммунопозитивных клеток к ядерному фактору NF-kB составила $16,24 \pm 1,6\%$ ($p < 0,05$), что свидетельствовало о сохранении воспаления. При этом определялись единичные позитивно окрашенные клетки к FGF-1 ($21,76 \pm 3,4\%$, $p < 0,05$), хаотично расположенные среди соединительнотканых волокон. В поле зрения преобладали сосуды, что свидетельствовало о нарушении процессов адгезиогенеза по отношению к срокам созревания спаек.

Снижение ОД иммунопозитивных клеток к NF-kB на 30-е сут. отмечалось и в группе ПК, что значительно отличалось от показателей на более ранних сроках - $15,02 \pm 1,4\%$ ($p < 0,05$). Иммунопозитивные клетки к NF-kB распределялись равномерно среди волокон соединительной ткани спаек, характеризующиеся наличием небольшого количества сосудов и единичных клеток воспалительного ряда. В соединительной ткани спаек определялось большое количество фибробластов, однако иммунопозитивными к FGF-1 были некоторые клетки, ОД которых составила $26,51 \pm 1,5\%$ ($p < 0,05$).

В III опытной группе низкие показатели ОД позитивно окрашенных клеток к NF-kB ($14,37 \pm 1,5\%$, $p < 0,05$) также отличались по сравнению с 10-ми и 20-ми сутками эксперимента. Однако в процентном отношении на 30-е сутки данный показатель оставался достаточно высоким с большим числом иммунопозитивных клеток к NF-kB. Созревание соединительной ткани сопровождалось изменением экспрессии FGF-1, где определялось множество иммунопозитивных клеток, что свидетельствовало о прогрессирующем адгезиогенезе с формированием обилия соединительнотканых волокон. При этом ОД позитивных клеток была выше, чем в ПК ($28,33 \pm 0,4\%$, $p < 0,05$), рис. 3.

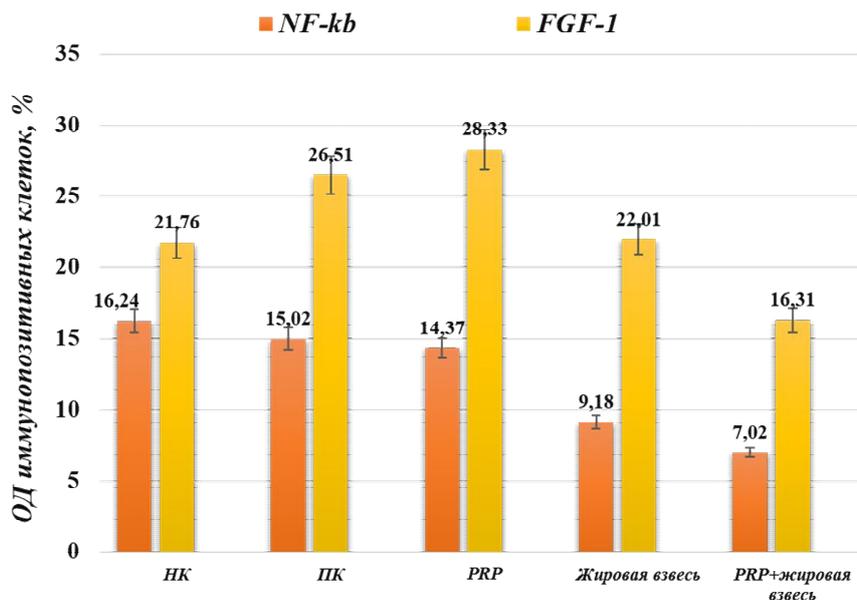


Рис. 3. Хроническая эмпиема плевры. 30-е сутки эксперимента.
Показатели экспрессии NF-kb и FGF-1, $p < 0,05$

В IV и V опытных группах на 30-е сут. наблюдалось незначительное число иммунопозитивных клеток к NF-kB, где ОД составила $9,18 \pm 0,8\%$ и $7,02 \pm 1,2\%$ соответственно ($p < 0,05$), что подтверждает отсутствие воспалительного инфильтрата и наличие зрелой соединительной ткани с преобладанием коллагеновых волокон. Иммунопозитивные клетки к FGF-1 в соединительной ткани особей IV опытной группы составляли $22,01 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$), что незначительно отличалось от показателей группы НК и ПК на этом сроке. В то же время в V группе выявлены единичные иммунопозитивные клетки ($11,49 \pm 3,2\%$, $p < 0,05$), что свидетельствует о высокой степени зрелости соединительной ткани.

Выводы. Таким образом, в результате иммуногистохимического исследования было установлено, что на 20-е сут. эксперимента максимальные значения иммунопозитивных клеток к FGF-1 и NF-kB были зафиксированы в группе сочетанного потенцирования адгезиогенеза, что свидетельствовало о высокой пролиферативной активности фибробластов

и усилении их синтетической функции с заполнением соединительной тканью остаточной плевральной полости. Однако к 30-м сут. в этой группе наблюдается резкое снижение ОД иммунопозитивных клеток к обоим маркерам, что указывает на формирование зрелой спайки и снижению продукции внеклеточного матрикса, что в свою очередь свидетельствует о безопасности применения данного способа при хронической эмпиеме плевры. В то же время в группах контроля и при изолированном применении плазмы, обогащенной тромбоцитами, на этом сроке экспрессия FGF-1 сохраняется, что в сочетании с увеличением процента иммунопозитивных клеток к NF-κB фактору свидетельствует о неконтролируемом спайкообразовании и может привести к тотальному заращению плевральной полости.

Список литературы

1. Divangahi M., King I.L., Pernet E. Alveolar macrophages and type I IFN in airway homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 2015. vol. 36. P. 307–314. DOI: 10.1016/j.it.2015.03.005.
2. Калашников А.В., Воробьев А.А., Салимов Д.Ш., Калашникова С.А., Айдаева С.Ш. Стимуляция адгезиогенеза при хронической эмпиеме плевры // *Новости хирургии.* 2018. Т.26, №4. С. 412-420. DOI: 10.18484/2305-0047.2018.4.412.
3. Christian N.M., Karin A., Michael K., Trine R.T., Ram B. Pleural infection: a retrospective study of clinical outcome and the correlation to known etiology, co-morbidity and treatment factors. *BMC Pulm Med.* 2018. vol. 18. P. 160. DOI: 10.1186/s12890-018-0726-1.
4. Knezevic L., Schaupper M., Muhleder S., Schimek K., Hasenberg T., Marx U., Engineering blood and lymphatic microvascular networks in fibrin matrices. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2017. vol. 5. P. 25. DOI: 10.3389/fbioe.2017.00025.
5. Зорина А., Зорин В., Шоколова С. Опыт применения аутологичных дермальных фибробластов в терапии псориаза // *Kosmetik international.* 2019. №2. С.58-65.
6. Hitesh B., Veena B.A. Pleural mesothelial cells in pleural and lung diseases. *J. Thorac. Dis.* 2015. vol. 7, no 6. P. 964–980. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.02.19.
7. 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.
8. Owens S., Jeffers A., Boren J. Mesomesenchymal transition of pleural mesothelial cells is PI3K and NF-κB dependent. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2015. vol. 308, no 12. P. 1265–1273.

9. 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.
10. Калашников А.В., Калашникова С.А., Айдаева С.Ш. Способ моделирования остаточных плевральных полостей // Рационализаторское предложение. №6 от 22.01.2018 г.