

С. Ш. Айдаева¹, С. А. Калашникова², Л. В. Полякова¹, А. В. Калашников¹

¹ Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ, г. Пятигорск;

² ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ

АПОПТОЗ-ОПОСРЕДОВАННЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕГРАДАЦИИ СПАЕК ПРИ СТИМУЛИРОВАННОМ АДГЕЗИОГЕНЕЗЕ

УДК 615.032:616.25-002.28:616.712

Одним из современных направлений в лечении остаточных полостей при хронической эмпиеме плевры является стимулирование адгезиогенеза с использованием различных биологических субстратов. В результате исследования было установлено, что в группах с изолированным применением жировой ткани и сочетанным применением жировой ткани с плазмой, обогащенной тромбоцитами, наступает раннее созревание соединительной ткани, характеризующееся наличием высоких показателей иммунопозитивных клеток к маркерам апоптоза уже на 20-е сутки с резким снижением этих показателей к концу эксперимента. При этом наличие единичных позитивно окрашенных клеток к ядерному фактору NF-kb подтверждает отсутствие воспалительной реакции в этих группах. В то время как при изолированном применении плазмы, обогащенной тромбоцитами, процентное содержание позитивно окрашенных клеток к каспазе-3 и активной каспазе-3 сохраняется до конца эксперимента. Высокие показатели ОД иммунопозитивного материала к транскрипционному фактору в этой группе указывают на сохранение воспалительной реакции, что может привести к дальнейшей стимуляции адгезиогенеза с полным заращением остаточной полости и развития дыхательной недостаточности.

Ключевые слова: хроническая эмпиема плевры, спайкообразование, остаточная плевральная полость, апоптоз, каспаза-3, активная каспаза-3, транскрипционный фактор (NF-kb p65).

S. Sh. Aidaeva, S. A. Kalashnikova, L. V. Polyakova, A. V. Kalashnikov

APOPTOSIS-MEDIATED MECHANISM OF ADHESION DEGRADATION IN STIMULATED ADHESIOGENESIS

One of the current trends in the treatment of residual cavities in chronic pleural empyema is the stimulation of adhesionogenesis using various biological substrates. As a result of the study, it was found that in groups with isolated use of adipose tissue and combined use of adipose tissue with platelet-rich plasma, early maturation of connective tissue occurs, characterized by the presence of high rates of immunopositive cells to apoptosis markers as early as 20 days with a sharp decrease in these indicators by the end of the experiment. The presence of single positively colored cells to the nuclear factor NF-kb confirms the absence of an inflammatory response in these groups. While in isolated application of platelet-rich plasma, the percentage of positively colored cells to caspase-3 and active caspase-3 remains until the end of the experiment. High levels of immunopositive material resistance to the transcription factor in this group indicate the preservation of the inflammatory response, which may lead to further stimulation of adhesion with complete overgrowth of the residual cavity and the development of respiratory failure.

Key words: chronic pleural empyema, adhesionogenesis, residual pleural cavity, apoptosis, caspase-3, active caspase-3, transcription factor (NF-kb p65).

На сегодняшний день одним из современных направлений лечения остаточной полости при хронической эмпиеме плевры является стимулирование адгезиогенеза. В основе предлагаемого нами способа лечения хронической эмпиемы плевры лежит стимуляция спайкообразования факторами роста, которыми богата плазма, обогащенная тромбоцитами [2, 6], и полустволовыми клетками, которые способны дифференцироваться в клетки соединительной ткани [4, 7]. Внутриплевральные сращения приводят к заращению остаточной плевральной полости и ликвидации хронического источника инфекции, снижая риск рецидива заболевания [1, 8]. Однако открытыми остаются несколько вопросов: является ли дан-

ный процесс контролируемым и не приведет ли потенцируемый нами адгезиогенез к тотальному заращению плевральной полости с дальнейшим развитием дыхательной недостаточности. В связи с этим остается актуальным изучение клеточной регрессии спаек и определение безопасности использования биологической стимуляции адгезиогенеза при лечении хронической эмпиемы плевры [3, 5].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить наличие апоптоз-опосредованного механизма деградации спаек при стимулированном адгезиогенезе при моделировании хронической эмпиемы плевры.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование проводилось на 360 нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 280–300 г., которые 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»; использование экспериментальных животных признано необходимым, допускается и регламентируется ст. 25 и 26 «Европейской конвенции о защите позвоночных 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).

Экспериментальная часть исследования была разделена на два этапа. Для начала всем животным была смоделирована хроническая эмпиема плевры с остаточной плевральной полостью, которая формировалась в течении 28 дней при введении млрд. взвеси *E.coli* в V межреберье по подмышечной линии [4]. Далее животные были разделены на четыре экспериментальные группы по 90 особей в каждой. В контрольной группе лечение не проводилось. В то время как животным опытных групп осуществляли биологическую стимуляцию адгезиогенеза путем введения плазмы, обогащенной тромбоцитами, в I группе (PRP, набор для забора крови Plasmolifting™, ООО «Плазмолифтинг», г. Казань, Россия. ТУ 9437-002-27837594-2015, регистрационное удостоверение № РЗН 2016/3980 от 19.04.2016); аутологичной жировой взвеси во II группе (липофилинг) и сочетанного применения биологических субстратов.

Для иммуногистохимического исследования использовали поликлональные кроличьи антитела Anti Caspase-3 antibody (Abcam, Англия) и Anti-aktive Caspase-3 antibody (Abcam, Англия), а также Anti-NF-κB p65 antibody (Abcam, Англия). Исследование образцов проводили с использованием микроскопа «LeicaDM 100» (Leica Mikrosystems GmbH, Германия) с цифровой фотокамерой. Для определения выраженности экспрессии маркеров использовали программы LAS Version 4.2.7. Статистические данные были получены с использованием программных паке-

тов EXEL 10.0 (Microsoft, USA) с определением критерия Колмогорова – Смирнова, t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате иммуногистохимического исследования на ранних сроках во всех экспериментальных группах наблюдается выраженная экспрессия транскрипционного фактора NF-κB, что объясняется сохранением воспалительного инфильтрата, характеризующегося наличием лейкоцитов, лимфоцитов и единичных макрофагов. В контрольной группе объемная доля иммунопозитивных клеток составила ($28,32 \pm 1,2$) %, в I группе – ($32,45 \pm 0,8$) %, во II группе – ($36,15 \pm 0,3$) %, а в III группе – ($39,81 \pm 0,5$) % ($p < 0,05$). В то время как при использовании антител к каспазе-3 и активной каспазе-3 на 10-е сутки основная масса клеточных элементов была иммунонегативной с наличием единичных позитивно окрашенных клеток с наибольшими показателями в группе с сочетанным потенцированием адгезиогенеза. Так, в контрольной группе процентное содержание позитивно окрашенных клеток к каспазе-3 и активной каспазе-3 составило ($6,83 \pm 0,5$) % и ($7,09 \pm 0,8$) % соответственно, при PRP – ($7,15 \pm 0,8$) % и ($8,25 \pm 1,2$) %, при липофилинге – ($7,92 \pm 1,5$) % и ($9,8 \pm 0,5$) %, при сочетанном использовании PRP и липофилинга – ($9,26 \pm 1,2$) % и ($10,32 \pm 1,5$) % ($p < 0,05$).

Экспрессия иммунопозитивного материала на 10-е сутки хронической эмпиемы плевры к каспазе-3, активной каспазе-3 и транскрипционному фактору NF-κB представлено на рис. 1.

На 20-е сутки в контрольной группе и с использованием PRP-технологии экспрессия иммунопозитивных клеток к ядерному фактору сохранялась [($29,84 \pm 0,8$) % и ($30,92 \pm 1,2$) % соответственно]. В то время как в группах с применением липофилинга и сочетанного использования PRP-технологии и жировой ткани наблюдалось заметное снижение ОД позитивно окрашенных клеток к NF-κB, что составило ($14,51 \pm 1,5$) % и ($12,08 \pm 0,8$) % соответственно ($p < 0,05$). При анализе экспрессии каспазы-3 и активной каспазы-3 было выявлено незначительное повышение иммунопозитивных клеток в группе без лечения [($7,92 \pm 0,5$) % и ($9,13 \pm 0,8$) % соответственно] и при изолированном применении плазмы, обогащенной тромбоцитами [($10,35 \pm 1,2$) % и ($12,06 \pm 0,5$) % соответственно]. При этом в образцах II и III групп процент иммунопозитивного материала к каспазе-3 и к активной каспазе-3 был значительно выше.

Так, при изолированном применении жировой ткани ОД иммунопозитивных клеток к каспазе-3 составила ($24,33 \pm 1,2$) %, к активной каспазе-3 – ($38,62 \pm 1,1$) %, а при сочетанном применении – ($34,26 \pm 1,5$) % и ($52,83 \pm 1,2$) % соответственно,

что в 4,3 и 5,7 раза больше по сравнению с группой НК ($p < 0,05$).

На рис. 2 представлена сравнительная характеристика экспрессии маркеров на 20-е сутки хронической эмпиемы плевры.

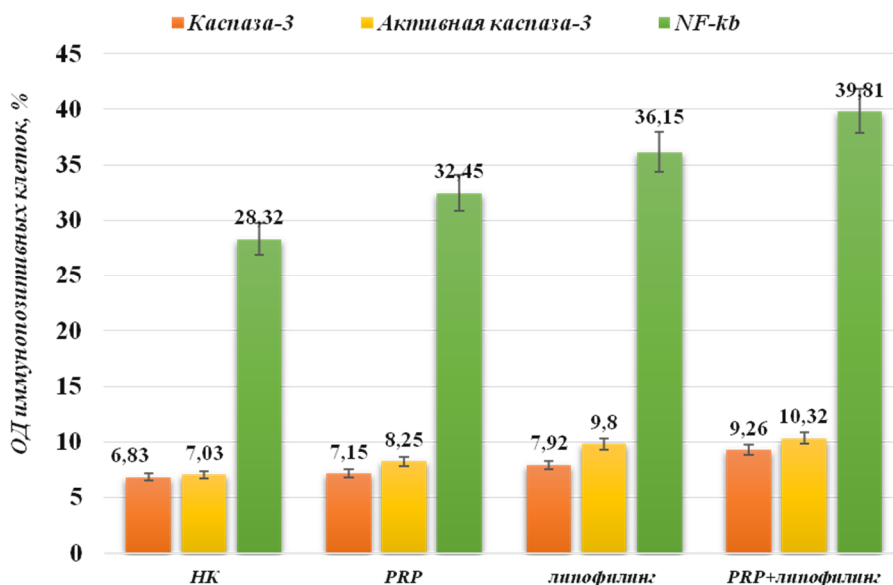


Рис. 1. Хроническая эмпиема плевры на 10-е сутки: экспрессия антител к каспазе-3, к активной каспазе-3 и NF-kb, $p < 0,05$

На поздних этапах эксперимента иммуногистохимическое исследование выявило снижение уровня иммунопозитивных клеток к NF-kB во всех экспериментальных группах с наименьшим процентным соотношением во II и III группах. ОД по-

зитивно окрашенных клеток к транскрипционному фактору в группе НК составила ($16,85 \pm 1,5$) %, в I группе – ($14,11 \pm 1,2$) %, во II группе – ($9,86 \pm 0,5$) %, а в III группе – ($7,15 \pm 0,8$) %, что в 2,3 раза меньше по сравнению с контролем.

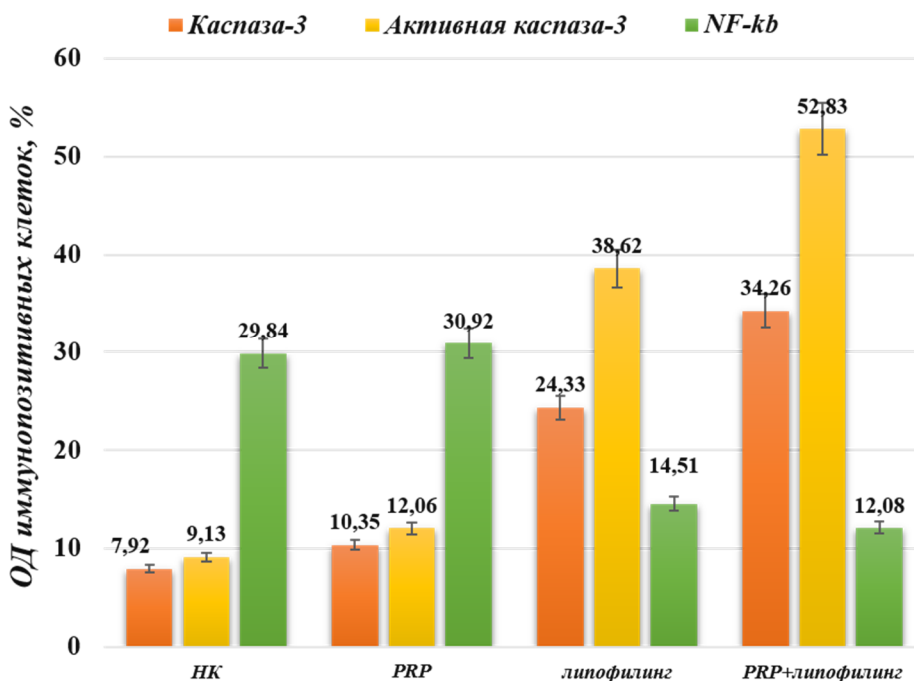


Рис. 2. Хроническая эмпиема плевры на 20-е сутки: экспрессия антител к каспазе-3, к активной каспазе-3 и NF-kb, $p < 0,05$

Стоит отметить, что на фоне снижения ядерного фактора в группах контроля и при использовании PRP-технологии наблюдалась значительная экспрессия каспазы-3 и активной каспазы-3 по сравнению с ранними сроками: контрольная группа – (15,24 ± 1,2) % и (22,37 ± 0,5) % соответственно; I группа – (23,56 ± 1,5) % и (32,17 ± 1,2) % соответственно ($p < 0,05$). В то время как во II и III группах зафиксировано резкое снижение количества позитивно окрашен-

ных клеток к обеим формам каспазы. При липофиллинге процентное содержание иммунопозитивных клеток к каспазе-3 составило (14,82 ± 0,5) % и (18,15 ± 1,5) % к активной каспазе-3, в группе с сочетанной биостимуляцией адгезиогенеза – (11,92 ± 0,8) % и (13,04 ± 1,1) % соответственно ($p < 0,05$). Экспрессия иммунопозитивного материала к каспазе-3, активной каспазе-3 и NF-kb на 30-е сутки хронической эмпиемы плевры представлена на рис. 3.

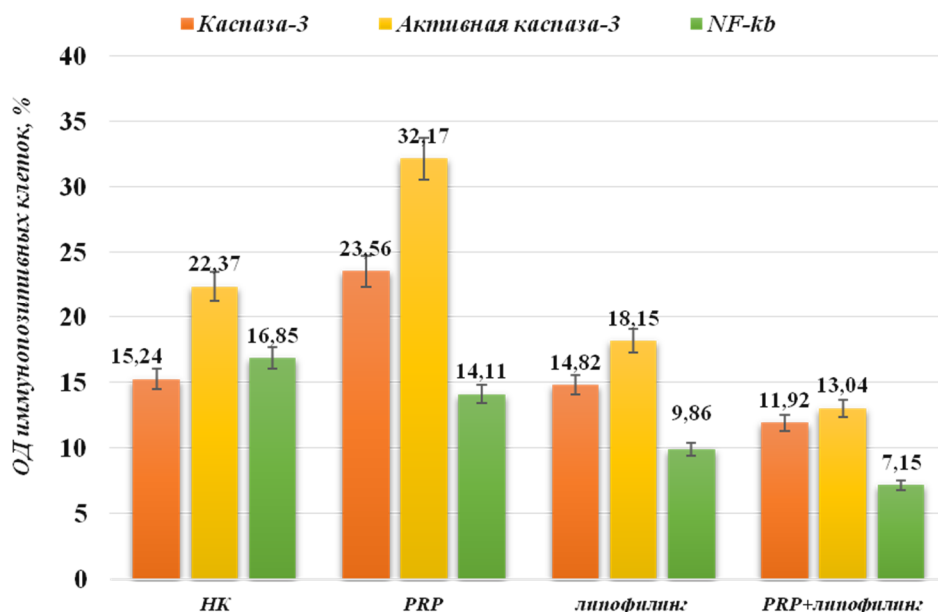


Рис. 3. Хроническая эмпиема плевры на 10-е сутки: экспрессия антител к каспазе-3, к активной каспазе-3 и NF-kb, $p < 0,05$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в экспериментальных группах на разных сроках хронической эмпиемы плевры были выявлены различные пути ремоделирования соединительной ткани. Так, при анализе полученных иммуногистохимических данных на 10-е сутки эксперимента наибольшие показатели ОД позитивно окрашенных клеток к каспазам-3 и транскрипционному фактору определялся в группах с использованием жировой ткани и с сочетанной биологической стимуляцией адгезиогенеза. При этом на 20-е сутки экспрессия обеих форм каспазы-3 в этих группах резко увеличивается на фоне снижения NF-kb с дальнейшим снижением ОД позитивно окрашенных клеток к маркерам апоптоза к концу эксперимента, что указывает на раннее созревание соединительной ткани в данных группах, характеризующееся утратой функционально активных фибробластов и клеток воспалительного ряда, а также уменьшением ОД сосудов.

Стоит отметить, что на 30-е сутки в группе НК и при использовании плазмы, обогащенной тромбоцитами, были зафиксированы наибольшие показатели иммунопозитивных клеток к каспазам и NF-kb, что говорит о нарушении в этих группах процессов созревания в фазу репаративных изменений. Экспрессия транскрипционного фактора связана с сохранением клеток лейкоцитарного и лимфоцитарного ряда, что, в свою очередь, может привести к формированию неконтрольного спаечного процесса и является неблагоприятным фактором при адгезиогенезе.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Воробьев, А. А.** Патологические проявления внутриплевральной адгезии / А. А. Воробьев, А. В. Калашников, Д. Ш. Салимов // Современная наука и инновации. – 2017. – № 1 (17). – С. 228 – 236. – Текст : непосредственный.
2. **Карагадян, А. Д.** Применение аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами, в дер-

- матокосметологии (обзор) / А. Д. Карагядян // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2017. – № 6. – С. 368 – 372. – Текст : непосредственный.
3. Программируемый некроз и регенерация тканей / Г. С. Копеина, А. В. Замараев, Б. Д. Животовский, И. Н. Лаврик // Гены & Клетки. – 2018. – Т. 13, № 2. – С. 35 – 38. – Текст : непосредственный.
 4. Рационализаторское предложение № 6 от 22.01.2018 г. Российская Федерация. Способ моделирования остаточных плевральных полостей / А. В. Калашников, С. А. Калашникова, С. Ш. Айдаева. – Текст : непосредственный.
 5. Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) / R. Rathore, J. E. McCallum, E. Varghese [et al.] // Apoptosis 22. – 2017. – P. 898 – 919. – Direct text.
 6. The Effects of Platelet-Rich Plasma and Adipose-Derived Stem Cells on Neovascularization and Fat Graft Survival / B. J. Xiong, Q. W. Tan, Y. J. Chen [et al.] // Aesthetic Plast Surg. – 2018. – Vol. 42, № 1. – P. 1 – 8. – Direct text.
 7. Platelet-Rich Plasma derived growth factors contribute to stem cell differentiation in musculoskeletal regeneration / Q. Yun, H. Qixin, Ch. Wei [et al.] // FrontChem. – 2017. – Vol. 5. – P. 89. – Direct text.
 8. Endothelin-1 Induces Mesothelial Mesenchymal Transition and Correlates with Pleural Fibrosis in Tuberculous Pleural Effusions / W. Zhung-Han, T. Jie-Heng, H. Cheng-Ying [et al.] // JClinMed. – 2019. – Vol. 8, № 4. – P. 426. – Direct text.