

И.А. Шурыгина<sup>1, 2</sup>, М.Г. Шурыгин<sup>1, 2</sup>, Н.И. Аюшинова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии, Иркутск, Российская Федерация

<sup>2</sup> Иркутский научный центр, Российская Федерация

## Экспрессия маркеров апоптоза при развитии спаечного процесса в брюшной полости в эксперименте

**Цель исследования:** изучить экспрессию маркеров каспаззависимого и каспазезависимого пути активации апоптоза в процессе репарации при повреждениях серозной оболочки брюшной полости. **Материалы и методы:** на модели экспериментального спаечного процесса в брюшной полости (самцы крысы линии Wistar, n = 40) в динамике (от 2 ч до 30 сут после повреждения брюшины) изучена экспрессия маркеров про- (Bcl-x) и антиапоптоза (Bcl-2), а также PARP-1. **Результаты:** установлено, что в условиях травматического повреждения брюшины процессы апоптоза и антиапоптоза протекают параллельно. При этом в начальный период преобладают механизмы антиапоптоза (более интенсивная окраска на Bcl-2), а в поздние сроки доминируют явления каспаззависимого проапоптоза (более интенсивная окраска на Bcl-x). Активация PARP-1 свидетельствует о повышении частоты повреждения структуры ДНК клеток, а длительность этого процесса стимулирует гибель клеток по каспаззависимому пути. В совокупности эти процессы приводят к элиминации большого числа клеток (в первую очередь фибробластического ряда) из зоны формирования соединительной ткани при асептическом воспалении в условиях травмы брюшины. Впервые установлено, что в случае повреждения брюшины экспрессия маркеров антиапоптоза в зоне повреждения имеет двухволновый характер с максимальной выраженностью на 1–3-и сут патологического процесса с повторным пиком на 14-е сут. **Выводы:** установленные ключевые звенья запуска апоптоза при формировании спаечного процесса в брюшной полости могут быть использованы для разработки лекарственных препаратов для профилактики развития спаек.

**Ключевые слова:** спайка, апоптоз, брюшина, Bcl-2, Bcl-x, PARP-1.

(Вестник РАМН. 2014; 5–6: 29–33)

29

### Введение

Апоптоз является одним из важнейших инструментов поддержания гомеостаза, причем его механизмы реализуются как при физиологических, так и при патологических состояниях. В настоящее время установлены основные механизмы реализации апоптоза в эукариотических клетках, активно ведутся исследования регуляторов и актива-

торов апоптоза. Интерес к данной проблеме обусловлен возможностью применения знаний о программируемой клеточной смерти в медицине при лечении различных заболеваний [1].

В регуляции апоптоза большая роль принадлежит белкам семейства Bcl, причем различают про- (Bax, Bad, Bcl, Bcl-xS, Bak, Bid, Bik, Bim, Krk, Mtd) и антиапоптозные белки (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A-1, Bcl-2) [2]. Предпо-

I.A. Shurygina<sup>1, 2</sup>, M.G. Shurygin<sup>1, 2</sup>, N.I. Ayushinova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery, Irkutsk, Russian Federation

<sup>2</sup>Irkutsk Scientific Centre, Russian Federation

## Expression of Apoptosis Markers in Adhesions in the Abdominal Cavity under the Experimental Conditions

**Background:** Our aim was to study the expression of markers of caspase-dependent and caspase-independent apoptosis pathway activation in the process of repair in case of damage of the serous membrane of the abdominal cavity. **Materials and methods:** On the experimental model of adhesions in the abdominal cavity (male rats Wistar, n = 40) in dynamics from 2 hours to 30 days after injury to the peritoneum studied marker expression pro-apoptosis (Bcl-x) and anti-apoptosis (Bcl-2), and PARP-1. **Results:** It was found that in the conditions of traumatic injury of the peritoneum apoptosis and anti-apoptosis occur in parallel. In the initial period of the anti-apoptosis mechanisms prevail, and in later periods dominated phenomena pro-apoptosis. PARP-1 activation indicates an increase in the frequency of DNA damage cells, and the duration of this process stimulates cell death by caspase-independent pathway. Together, these processes result in the elimination of a large number of cells, especially fibroblast of zone connective tissue formation in an aseptic area of inflammation in the peritoneal injury. We first established that in the case of peritoneal injury marker expression of anti-apoptosis in the damage zone has the character of the two-wave with maximum expression at 1-third day of the pathological process with repetitive peak on the 14th day. **Conclusion:** Identifying key parts of apoptosis in the formation of adhesions in the abdominal cavity, which can be used for the development of drugs for the prevention of adhesions.

**Key words:** adhesion, apoptosis, peritoneum, Bcl-2, Bcl-x, PARP-1.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014; 5–6: 29–33)

лагают, что соотношение про- и антиапоптозных белков имеет решающее значение в реализации программируемой гибели клетки. Регуляция апоптоза белками семейства Bcl-2 осуществляется преимущественно на отрезке митохондриального сигнального пути, поскольку сигналы рецепторзависимого сигнального пути в основном обходят контроль со стороны Bcl-2. Белки Bcl-2, Bcl-xL и Bax могут формировать трансмембранные каналы либо участвовать в их формировании. Например, Bcl-2 прямо или косвенно предотвращает высвобождение из митохондрий цитохрома C [3]. В противоположность этому Bax в комплексе с порином образует во внешней мембране митохондрий канал, по которому в цитоплазму высвобождаются цитохром C и апоптозиндуцирующий фактор (AIF). Помимо каналообразующей активности белки семейства Bcl-2 могут выступать в роли связывающихся с белками адаптеров, участвующих в процессе апоптоза.

Немаловажную роль в развитии апоптоза играют системы контроля целостности ДНК. Известно, что PARP-1 (cleaved p85) (Poly-[ADP-ribose]-polymerase 1) участвует в репарации ДНК. После расщепления ДНК ферментами, участвующими в клеточной смерти (например, каспазами), PARP-1 могут привести к истощению АТФ клетки в попытке восстановить поврежденную ДНК. Истощение АТФ ведет к гибели клетки. Кроме того, PARP-1 способен непосредственно индуцировать апоптоз через продукцию поли(АДФ-рибоза)-полимеразы, которая стимулирует митохондрии к выделению AIF. Этот механизм является каспазезависимым [4].

**Цель исследования:** изучить экспрессию маркеров каспаззависимого и каспазезависимого пути активации апоптоза в процессе репарации при повреждениях серозной оболочки брюшной полости.

## Материалы и методы

### Участники исследования

Моделирование спаечного процесса в брюшной полости у экспериментальных животных осуществляли по разработанному авторами способу, включающему вскрытие серозно-мышечного слоя слепой кишки длиной 1 см с последующим ушиванием раны швом Шмидена и скарификацию париетальной брюшины правого бокового канала размером 1,5×1,5 см [5, 6].

Эксперименты выполнены с использованием самцов крыс линии Wistar весом 220–250 г в возрасте 9 мес ( $n=40$ ). Выведение животных из эксперимента осуществляли в сроки от 2 ч до 30 сут. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с принципами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755). Все оперативные вмешательства выполнены в асептических условиях. Животных содержали в условиях сертифицированного вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, соответствующего нормативам ГОСТа. Протокол эксперимента одобрен Комитетом по биомедицинской этике Научного центра реконструктивной и восстановительной хирургии (протокол № 8 от 09.10.10 г.).

### Методы исследования

Фиксацию материала проводили в растворе FineFix (Milestone, Италия). Для изучения экспрессии маркеров апоптоза применяли иммуногистохимическое окраши-

вание препаратов с использованием первичных антител к Bcl-2 (Abbiotec, США) в рабочем разведении 1:300, к Bcl-x (Epitomics, США) в рабочем разведении 1:100 с докрасиванием гематоксилином, а также иммунофлуоресцентное окрашивание с применением первичных антител к PARP-1 (Epitomics, США) в рабочем разведении 1:50 и вторичных антител, меченных Alexa Fluor 568. Визуализацию осуществляли на исследовательском микроскопе Nikon Eclipse 80i (Nikon, Япония) с приставкой для эпифлуоресценции ДИМ-М.

## Результаты

При изучении экспрессии маркеров апоптоза установлено, что повышение интенсивности экспрессии Bcl-2 и Bcl-x в части клеток наблюдалось уже через 2 ч после моделирования спаечного процесса. Окрашивались единичные клетки в области кишечного шва и клетки в подслизистом слое в области раны. Через 6 ч после операции картина принципиально не изменилась: достаточные для визуализации количества Bcl-2 и Bcl-x экспрессировали единичные клетки в области повреждения брюшины. К 12 ч наблюдения окраска на маркеры семейства Bcl-2 значительно нарастала. На Bcl-2 ярко окрашивалось большое число клеток в области воспаления брюшины, отмечалась также окраска и на Bcl-x: слабо окрашивались клетки в области повреждения брюшины, отмечалась четкая окраска клеток в области кишечного шва (рис. 1а и 1е).

Через 1 сут после травмы на фоне формирования спаек, выраженной нейтрофильной инфильтрации области шва, а также подслизистого и мышечного слоя кишечной стенки, выраженной нейтрофильной инфильтрации брюшины интенсивность окраски на Bcl-2 и Bcl-x нарастала, при окраске на оба маркера ярко окрашивались клетки брюшины в области образования спайки, наблюдали много «положительных» клеток в подслизистом слое.

Через 3 сут после травмы на фоне формирования спаек между кишкой и сальником, а также местом повреждения брюшной стенки и сальником, между брюшной стенкой и кишечником, выраженного воспаления вокруг шва, обширного инфильтративного процесса в подслизистом и мышечном слое кишки, ярко выраженных признаков воспаления брюшины, разрастания молодой грануляционной ткани в месте формирования спаек (т.е. начала фибробластической фазы воспаления) наблюдали много окрашенных на Bcl-2 клеток в зоне повреждения в подслизистом слое, а также в зоне формирования спаек. Очень яркое окрашивание в зоне воспаления брюшины и в подслизистом слое отмечено при применении первичных антител к Bcl-x (рис. 1б и 1ж).

Через 7 сут на фоне формирования спаек большой протяженности без выраженной васкуляризации, наличия капсулы вокруг шва наблюдали достаточно яркую окраску на Bcl-x и слабую — на Bcl-2. При этом зоны окраски на данные маркеры не совпадали, также имела место яркая окраска брюшины (рис. 1в и 1з).

На 14-е сут на фоне формирования плотных васкуляризованных спаек, разрастания соединительной ткани вокруг шва зарегистрирована вторая волна выраженной экспрессии Bcl-2 и Bcl-x в клетках подслизистого слоя, в области формирования спаек, а также в зоне травмы передней брюшной стенки (рис. 1г и 1и).

К 30-м сут на фоне формирования богато васкуляризованных множественных спаек с высокой плотностью коллагеновых волокон обнаружена минимальная окраска

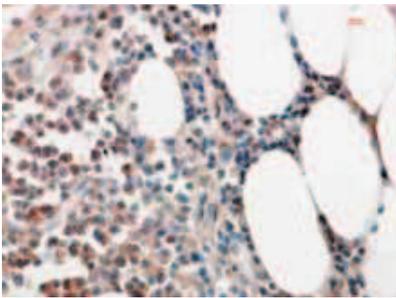
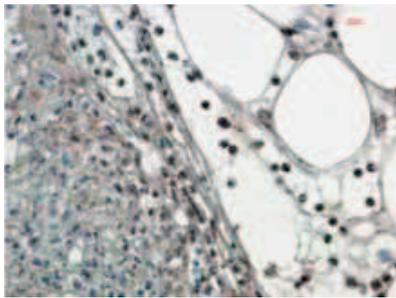
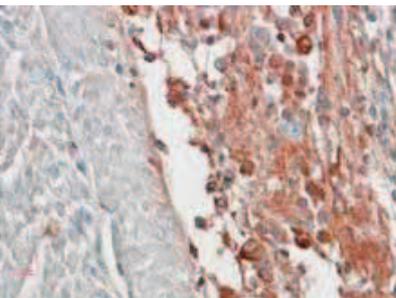
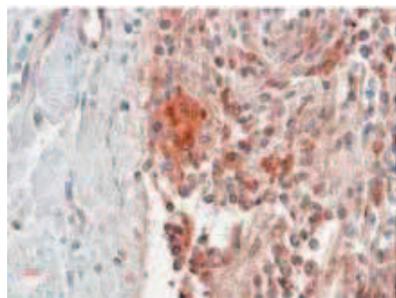
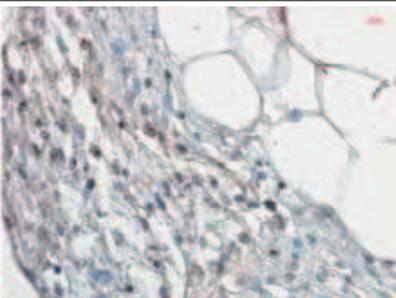
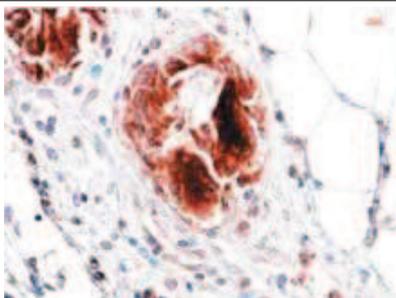
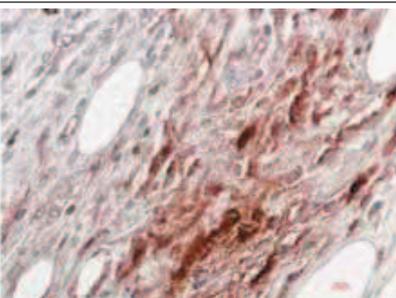
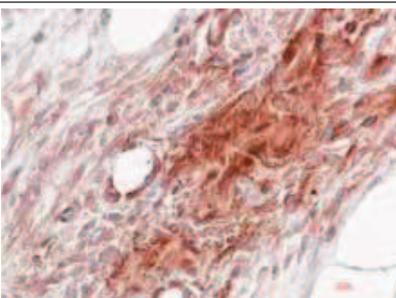
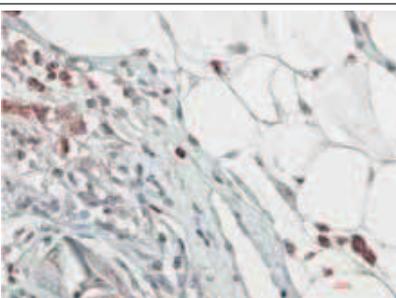
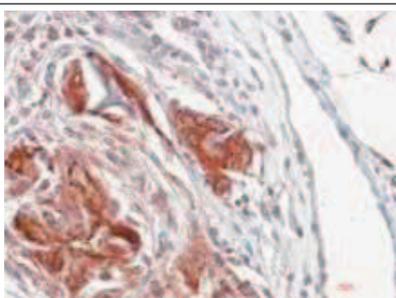
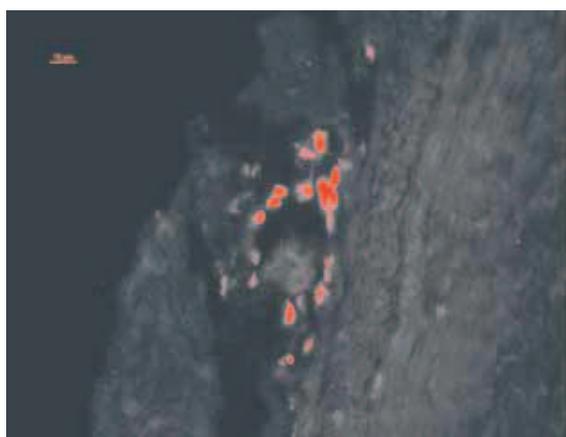
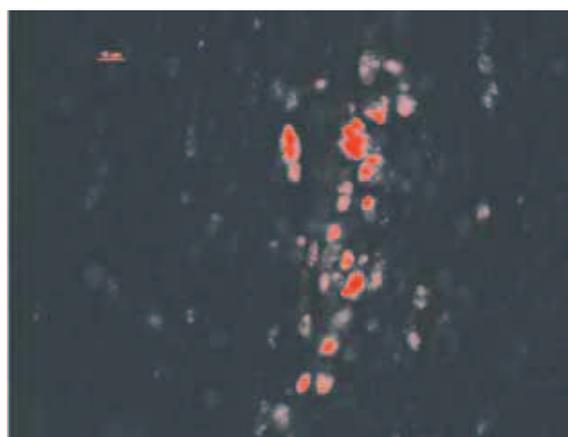
Срок	Bcl-2	Bcl-x
12 ч	 <p style="text-align: center;">а</p>	 <p style="text-align: center;">е</p>
3 сут	 <p style="text-align: center;">б</p>	 <p style="text-align: center;">ж</p>
7 сут	 <p style="text-align: center;">в</p>	 <p style="text-align: center;">з</p>
14 сут	 <p style="text-align: center;">г</p>	 <p style="text-align: center;">и</p>
30 сут	 <p style="text-align: center;">д</p>	 <p style="text-align: center;">к</p>

Рис. 1. Экспрессия Bcl-2 и Bcl-x в области формирования спайки. Иммуногистохимия, первичные антитела — Bcl-2 (а–д) и Bcl-x (е–к), докрасивание гематоксилином.



а



б

**Рис. 2.** Экспрессия PАРP-1 в зоне формирования спайки. Иммунофлуоресценция, первичные антитела к PАРP-1, вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 568.

*Примечание.* а — 7-е сут, б-е — 30-е сут.

32

на Vcl-2 в зоне пролиферации и яркая окраска в этой же зоне на Vcl-х (рис. 1д и 1к).

Кроме того, методом иммунофлуоресцентного окрашивания изучена экспрессия PАРP-1, участвующего в репарации ДНК. Установлено, что экспрессия PАРP-1 отмечается только с 7-х сут наблюдения. В более ранние сроки специфическая окраска не зарегистрирована. На 7-е сут обнаруживается много PАРP-1-положительных клеток в подслизистом слое и единичные клетки — в области травмы брюшины (рис. 2а). На 14-е, а затем на 30-е сут число таких клеток в зоне формирования спайки нарастало с достижением максимума на 30-е сут (рис. 2б).

### Обсуждение

Как известно, апоптоз является одним из основных механизмов элиминации миофибробластов и формирования зрелой рубцовой ткани с низ содержанием клеток и высоким содержанием коллагена [7].

Данные по изучению активности апоптоза при формировании спаек противоречивы. Так, М. Vinnebosel и соавт. [8] в проспективном исследовании 40 больных спаечной болезнью после хирургических вмешательств во всех случаях зафиксировали активацию апоптоза. В то же время G.M. Saed и соавт. [9] по результатам исследования методом полимеразной цепной реакции клеточных линий, выделенных от 5 больных со спаечной болезнью, установили, что экспрессия маркеров апоптоза в фибробластах, выделенных из спаек, по сравнению с нормальными фибробластами, резко снижена. Авторы считают, что снижение активности апоптоза может быть косвенной причиной интенсивности спайкообразования [10].

Нами установлено, что в условиях травматического повреждения брюшины процессы апоптоза и антиапоптоза протекают параллельно. И если в начальный период после травматического повреждения брюшины преобладают механизмы антиапоптоза (более интенсивная окраска на Vcl-2), то в поздние сроки доминируют явления каспаззависимого проапоптоза (более интенсивная окраска на Vcl-х). Активация PАРP-1 свидетельствует о повы-

шении частоты повреждения структуры ДНК клеток, а длительность этого процесса стимулирует гибель клеток по каспаззависимому пути. В совокупности эти процессы приводят к элиминации большого числа клеток, в первую очередь фибробластического ряда, из зоны формирования соединительной ткани в зоне асептического воспаления при травме брюшины.

Интересно, что в случае повреждения брюшины экспрессия маркеров антиапоптоза в зоне повреждения имеет двухволновый характер с максимальной выраженностью на 1–3-и сут патологического процесса с повторным пиком на 14-е сут. В эти сроки реализуется активный рост грануляционной ткани и процесс созревания соединительнотканых васкуляризованных спаек. При этом к концу наблюдения (30-е сут) активность экспрессии антиапоптозных белков в зоне повреждения становится крайне низкой, и объем клеточного компонента соединительной ткани значительно уменьшается.

### Заключение

По результатам исследования установлена динамика продукции про- и антиапоптозных белков при репаративном процессе в области повреждения брюшины, сопровождающемся формированием спаек. Определение двухволнового характера продукции Vcl-2 позволяет установить сроки, в которые подавление синтеза данного белка будет способствовать быстрой элиминации активных фибробластов. Также продемонстрировано, что высокая активность PАРP-1 в субмезотелиальных фибробластах при небольших метаболических резервах, характерных для данной области, может служить причиной запуска каспаззависимого апоптоза. Выявленные ключевые звенья запуска апоптоза при формировании спаечного процесса могут быть использованы для разработки лекарственных препаратов для профилактики развития спаек.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. по Государственному контракту № 14.740.11.0176 от 15.09.2010 г.*

REFERENCES

1. Karp G. Cell and molecular biology. Concepts and experiments. 6<sup>th</sup> edn. *New York: John Wiley & Sons*. 2010. 765 p.
2. Gordeeva A.V., Labas Y.A., Zvyagilskaya R.A. Apoptosis in unicellular organisms: Mechanisms and evolution. *Biochemistry (Moscow)*. 2004; 69 (10): 1055–1066.
3. Chao D.T., Korsmeyer S.J. BCL-2 family: regulators of cell death. *Ann. Rev. Immunol.* 1998; 16: 395–419.
4. Yu S.-W., Andrabi S.A., Wang H., Kim N.S., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson V.L. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proceed. Nat. Acad. Sci.* 2006; 103: 18314–18319.
5. Ayushinova N.I., Lepekhova S.A., Shurygina I.A., Roi T.A., Shurygin M.G., Zaritskaya L.V., Gol'dberg O.A. *Sposob modelirovaniya spaechnogo protsessa v bryushnoi polosti: Patent RF № 2467401. Zayavka: 2011131678/14, 27.07.2011* [] 2012. 9 p.
6. Ayushinova N.I., Shurygina I.A., Shurygin M.G., Lepekhova S.A., Balykina A.V., Malgataeva E.R., Popova A.D., Yankelevich S.A. *Sib. med. zhurn – Siberian medical journal*. 2012; 109(2): 51–53.
7. Wight T.N., Potter-Perigo S. The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2011; 301: 950–955.
8. Binnebosel M., Klinge U., Rosch R., Junge K., Lynen-Jansen P, Schumpelick V. Morphology, quality, and composition in mature human peritoneal adhesions. *Langenbecks Arch. Surg.* 2008; 393 (1): 59–66.
9. Saed G.M., Jiang Z., Fletcher N.M., Diamond M.P. Modulation of the BCL-2/BAX ratio by interferon-gamma and hypoxia in human peritoneal and adhesion fibroblasts. *Fertil. Steril.* 2008; 90 (5): 1925–1930.
10. Saed G.M., Diamond M.P. Molecular characterization of postoperative adhesions: the adhesion phenotype. *J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc.* 2004; 11 (3): 307–314.

FOR CORRESPONDENCE

**Shurygina Irina Aleksandrovna**, PhD, Deputy Director for Research and Innovative Activity of Research Center of Reconstructive and anaplastic surgery, chief research scientist of the Department of Medicobiological Study and Technologies of the Irkutsk Scientific Center.

**Address:** 1, Bortsov Revolyutsii Street, Irkutsk, RF, 664003; **tel.:** +7 (3952) 29-03-38, **e-mail:** irinashurygina@gmail.com

**Shurygin Mikhail Gennad'evich**, PhD, Head of Research and Experimental Department of Research Center of Reconstructive and anaplastic surgery, chief research scientist of the Department of Medicobiological Study and Technologies of the Irkutsk Scientific Center.

**Address:** 1, Bortsov Revolyutsii Street, Irkutsk, RF, 664003; **tel.:** +7 (3952) 29-03-38, **e-mail:** shurygin@rambler.ru

**Ayushinova Natal'ya Il'ichna**, MD, doctor of the Department of Purulent surgery of Clinic Hospital № 1 of Research Center of Reconstructive and anaplastic surgery.

**Address:** 100, Yubileinyi microroiaon, Irkutsk, RF, 664079; **tel.:** +7 (3952) 40-78-74 , **e-mail:** katnatlove@mail.ru