

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-174-2-91-94

УДК 616.381–007.274–092.9

## Участие механизмов передачи сигнала и регуляции генов каскадом MAPK p38 (митоген-активируемых протеинкиназ) в репарации повреждений серозной оболочки брюшной полости\*

Шурыгина И. А., Аюшинова Н. И., Родионова Л. В., Чепурных Е. Е., Шурыгин М. Г.

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск, Россия

## The participation of signal transduction and gene regulation mechanisms in the cascade of MAPK p38 (mitogen-activated protein kinases) in the repair of damage to the serous membrane of the abdominal cavity\*

I. A. Shurygina, N. I. Ayushinova, L. V. Rodionova, E. E. Chepurnyh, M. G. Shurygin

Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia

**Для цитирования:** Шурыгина И. А., Аюшинова Н. И., Родионова Л. В., Чепурных Е. Е., Шурыгин М. Г. Участие механизмов передачи сигнала и регуляции генов каскадом MAPK p38 (митоген-активируемых протеинкиназ) в репарации повреждений серозной оболочки брюшной полости. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2020;174(2): 91–94. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-174-2-91-94

**For citation:** Shurygina I. A., Ayushinova N. I., Rodionova L. V., Chepurnyh E. E., Shurygin M. G. The participation of signal transduction and gene regulation mechanisms in the cascade of MAPK p38 (mitogen-activated protein kinases) in the repair of damage to the serous membrane of the abdominal cavity. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2020;174(2): 91–94. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-174-2-91-94

**Шурыгина Ирина Александровна**, д.м.н., проф. РАН, зам. директора по научной работе, зав. лабораторией клеточных технологий и регенеративной медицины

**Аюшинова Наталья Ильинична**, к.м.н., врач отделения гнойной хирургии № 1

**Родионова Любовь Викторовна**, к.б.н., зав. лабораторией клеточной патофизиологии и биохимии

**Чепурных Елена Евгеньевна**, к.м.н., ученый секретарь

**Шурыгин Михаил Геннадьевич**, д.м.н., зав. научно-лабораторным отделом

Irina A. Shurygina, Doctor of Med. Sci., prof. RAS, Deputy Director for Research; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3980-050X>

Nataliya I. Ayushinova, Cand. of Med. Sci., Surgeon of the Department of Purulent Surgery N1;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5200-3962>

Lubov V. Rodionova, Cand. of Biol. Sci., Head of the laboratory; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5080-9225>

Elena E. Chepurnyh, Cand. of Med. Sci., Scientific Secretary; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3197-4276>

Michail G. Shurygin, Doctor of Med. Sci., Chief of the Scientific and Laboratory Department;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5921-0318>

✉ *Corresponding author:***Шурыгина****Ирина Александровна**

Irina A. Shurygina

[irinashurygina@gmail.com](mailto:irinashurygina@gmail.com)

\* Иллюстрации к статье – на цветной вклейке в журнал.

\* Illustrations to the article are on the colored inset of the Journal.

### Резюме

**Цель исследования:** оценка активности p38 MAPK при повреждении серозной оболочки.

**Материал и методы.** На 40 крысах линии Вистар моделировали спаечный процесс в брюшной полости. Проводили иммуногистохимическое окрашивание зоны спайкообразования на p38 MAPK и p38 MAPK Phospho. с помощью Real-time ПЦР исследовали экспрессию генов, кодирующих p38 MAP в зоне повреждения. 5 интактных животных служили в качестве контроля.

**Результаты.** При иммуногистохимическом окрашивании зоны повреждения установлено, что пик активности p38 приходится на 14 сутки, фосфорилированной части p38 MAPK — на третьи.

При оценке экспрессии генов p38 MAPK установлено, что пик активности генов Mapk12 приходился на 3-и и 14-е сутки, Mapk13 — на 12 часов и 7 суток, Mapk11 и Mapk14 — на 14-е сутки. Достоверность различий по сравнению с интактными животными ( $p < 0,05$ ) для MAPK12 — отмечена в срок 3 суток, для MAPK13 — на 12 часов, 3 и 7 суток

**Заключение.** Таким образом, в ходе исследования нами выявлена экспрессия p38 MAPK каскада при естественном течении репаративного процесса. Показано, что активация каскада начинается с 6 часов после повреждения и сохраняется до 30 суток с максимумом выраженности активности на 14 сутки.

**Ключевые слова:** спаечная болезнь, брюшная полость, p38 MAP-киназа, экспериментальные исследования

## Summary

**Objective:** to assess the activity of p38 MAPK in serosal injury.

**Material and methods.** We modelled adhesive process in abdomen in 40 Wistar rats. Adhesion zone was immunohistochemically stained for p38 MAPK and p38 MAPK Phospho. Expression of p38 MAPK-coding genes was studied in the injured zone using RT-PCR. The control group consisted of 5 intact Wistar rats.

**Results.** As a result of immunohistochemical staining of adhesion zone we determined that peak of p38 expression is registered on the 14th day after surgery, but phosphorylated p38 MAPK activity peak — on the 3rd day.

Assessment of p38 MAPK genes expression showed that Mapk12 genes was expression peaks on the 3<sup>rd</sup> and 14<sup>th</sup> day, Mapk13 — in 12 hours and on the 7<sup>th</sup> day, Mapk11 and Mapk14 — on the 14<sup>th</sup> day. Statistical significance in comparison with data obtained in intact animals ( $p < 0,05$ ) for MAPK12 was registered on the 3<sup>rd</sup> day, for MAPK13 — in 12 hours, on the 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> day.

**Conclusion.** Our research allowed us to determine p38 MAPK cascade expression in non-changed reparative process. It was found that p38 MAPK cascade activation starts from the 6<sup>th</sup> hour after the surgery and lasts up to 30<sup>th</sup> day with its maximum on the 14<sup>th</sup> day.

**Keywords:** peritoneal adhesions, abdominal cavity, p38 MAP kinase, experimental studies

## Введение

Как известно, MAPK (mitogen activated protein kinases) являются важным звеном регуляции экспрессии генов в ответ на внешние стимулы [1]. При этом группа так называемых p38 MAP-киназ активируется при воздействии провоспалительных цитокинов, факторов роста, отвечает за реализацию воспалительного ответа, развитие апоптоза [2]. Установлено, что активация p38 MAPK ведет к усилению фиброза [3]. Такой эффект зафиксирован при воздействии на первичные менингеальные

мезотелиальные клетки [4], фибробласты оболочки глаза [5]. В то же время использование пролонгированной блокады p38 MAP каскада позволяет снизить плотность коллагеновых волокон в зоне послеоперационного рубца [6], а также снизить интенсивность спаечного процесса в брюшной полости при травме брюшины [7, 8].

**Целью** настоящего исследования явилась оценка активности p38 MAPK при повреждении серозной оболочки.

## Материалы и методы исследования

Моделировали асептический воспалительный процесс в брюшной полости с использованием 40 самцов крыс линии Wistar в возрасте 9 мес. путём вскрытия серозно-мышечного слоя слепой кишки с последующим ушиванием раны швом типа Шмидена и скарификации париетальной брюшины правого бокового канала [9]. Эксперименты выполнялись в соответствии с нормами гуманного обращения с животными, исследование одобрено Комитетом по этике ИНЦХТ.

Фиксацию материала проводили в растворе FineFix (Milestone, Италия), осуществляли проводку и заливку материала в парафиновые блоки, изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм.

Проводили иммуногистохимическое окрашивание. В качестве первичных антител применяли:

1. p38 MAPK Rabbit Monoclonal Antibody (Epitomics, Clone ID: Y122, Cat. N1544-1, Lot YE-02-12-11C), рабочее разведение 1:200;
2. p38 MAPK Phospho (pT180/pY182) (MAPK14) Rabbit Monoclonal Antibody (Epitomics, Clone ID: E229, Cat. N1229-1, Lot YH080601C, рабочее разведение 1:100.

В качестве вторичных антител использовали Novolink Polymer (Novocastra, REF=7112, Lot 6006512). Срезы докрашивали 0,02% раствором гематоксилина Эрлиха. Для визуализации препаратов применяли микроскоп Nikon 80i. Исследование проведено в сроки от 2 часов до 30 суток.

Для исследования в зоне повреждения экспрессии генов, кодирующих p38 MAPK, использовали наборы для ПЦП MAP Kinase Signaling Pathway RT<sup>2</sup>-Profiler™ PCR Array (Qiagen GmbH, Германия, кат. № PARN-061Z). Процедура ПЦП проведена на приборе BioRAD CFX 96. Исследования проведены в сроки от 12 часов до 14 суток.

Контролем служили исследования серозно-мышечного слоя слепой кишки у интактных животных ( $n = 5$ ).

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием оригинальной on-line программы анализа массивов данных, полученных на наборах RT<sup>2</sup>\_Profiler PCR ARRAY фирмы SA Bioscience – [http://www.qiagen.com/Products/Genes and Pathways/Data Analysis Center Overview Page/RT2 Profiler PCR Arrays Data Analysis Center/](http://www.qiagen.com/Products/Genes%20and%20Pathways/Data%20Analysis%20Center/Overview/RT2%20Profiler%20PCR%20Arrays%20Data%20Analysis%20Center/).

## Результаты исследования и обсуждение

Установлено, что при окраске на нефосфорилированную часть p38 MAP-киназного каскада через 2 часа после начала эксперимента в мезотелии в области травмы наблюдалась только минимальная окраска, через 6 часов наблюдалась незначительная активация в клетках субсерозного слоя. Через 12 часов отмечена умеренная активация p38 MAPK каскада в клетках перитонеума, субсерозы, десквамированных мезотелиоцитах и салнике. Через 1 сутки после начала эксперимента интенсивность экспрессии MAP-киназного каскада нарастала. Отмечалась значительная экспрессия в салнике и мезотелиоцитах, умеренная – в субсерозном слое клеток.

Через 3 суток наблюдалась выраженная экспрессия p38 MAPK, особенно ярко проявляющаяся в клетках субсерозного слоя (Рис. 1).

На 7-е сутки сохранялась умеренная экспрессия p38 в клетках мезотелия и прилегающих слоёв (Рис. 2).

На 14-е сутки выявлена ярко выраженная экспрессия p38, при этом специфическая окраска зафиксирована в мезотелии и субсерозных областях (Рис. 3). К концу наблюдения (30 суток) сохранялась умеренная экспрессия p38 в клетках субсерозного слоя.

Нами проведена также оценка содержания в тканях в зоне повреждения активной формы p38 – p38 phospho. Установлено, что повышение экспрессии активной части p38 MAPK каскада наблюдается с 6 часов до 14 суток, и только к концу наблюдения снижается до фоновых значений. Максимальная интенсивность окраски приходится на 3-и сутки (Рис. 4).

Проведена оценка экспрессии генов регуляторных каскадов в зоне заживления раны, с помощью набора для ПЦР MAP Kinase Signaling Pathway RT<sup>2</sup>-Profiler™ PCR Array (Qiagen GmbH, Германия, кат. № PARN-061Z). Результаты представлены по отношению к экспрессии генов в области серозно-мышечного слоя слепой кишки у интактных животных.

При оценке экспрессии генов MAPK (Mapk11, Mapk12 (p38gMAPK), Mapk13, Mapk14 (p38 MAPK)) установлено, что уровень экспрессии Mapk13 был повышен весь период наблюдения.

Пик активности генов Mapk12 (p38gMAPK) приходился на 3-и и 14-е сутки, Mapk13 – на 12 часов и 7 суток, Mapk11 и Mapk14 (p38 MAPK) – на 14-е сутки (Рис. 5). Достоверность различий по сравнению с интактными животными ( $p < 0,05$ ) для MAPK12 – отмечена в срок 3 суток, для MAPK13 – на 12 часов, 3 и 7 суток.

Поскольку p38 MAPK активируются при повреждении и отвечают за дифференцировку и апоптоз клеток, очень важно знать временные сроки активации MAPK каскада для разработки мер целенаправленного воздействия на репаративный процесс. Однако до настоящего времени такой оценки в отношении травмы брюшины и последующей репарации не проводилось. Полученные результаты свидетельствуют об активном вовлечении p38 MAPK в репаративный процесс при повреждении брюшины, длительной активации каскадов. И обуславливают необходимость длительной (не менее 2 недель после травмы брюшины) профилактики процесса спайкообразования.

## Заключение

Таким образом, в ходе исследования нами выявлена экспрессия p38 MAPK каскада при естественном течении репаративного процесса, показано, что

активация каскада начинается с 6 часов после повреждения и сохраняется до 30 суток с максимумом выраженности активности на 14 сутки.

## Литература | References

1. Kyriakis J.M., Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol. Rev.* 2012, vol. 92, no.2, pp. 689–737. doi: 10.1152/physrev.00028.2011.
2. De Boer W.I. Perspectives for cytokine antagonist therapy in COPD. *Drug Discov. Today.* 2005, vol. 10, no.2, pp. 93–106. doi: 10.1016/S1359–6446(04)03300–8.
3. Шурьгина И.А., Шурьгин М.Г., Зеленин Н.В., Аюшинова Н.И. Воздействие на митогенактивируемые протеинкиназы как новое направление регуляции роста соединительной ткани. Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – Т. 16, № 4. – С. 75–86. Shurygina I. A., Shurygin M. G., Zelenin N. V., Ayushinova N. I. Influence on mitogen-activated protein kinases as a new direction of connective tissue growth regulation. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2017, vol. 16, no. 4, pp. 75–86. doi: 10.20538/1682–0363–2017–4–86–93.
4. Yue X.J., Guo Y., Yang H. J., Feng Z. W., Li T., Xu Y. M. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces fibrosis in rat meningeal mesothelial cells via the p38 signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 2016, vol. 14, no.2, pp. 1709–1713. doi: 10.3892/mmr.2016.5411.
5. Luo Y.H., Ouyang P. B., Tian J., Guo X. J., Duan X. C. Rosiglitazone inhibits TGF- $\beta$  1 induced activation of human Tenon fibroblasts via p38 signal pathway. *PLoS One.* 2014, vol. 9, no.8, e105796. doi: 10.1371/journal.pone.0105796. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4140818/> (Accessed 26 November 2019).
6. Shurygina I.A., Shurygin M. G., Ayushinova N. I., Granina G. B., Zelenin N. V. Mechanisms of connective tissue formation and blocks of mitogen activated protein kinase. *Front. Chem. Sci. Eng.* 2012, vol. 6, no.2, pp. 232–237. doi:10.1007/s11705–012–1286–1.

7. *Shurygin M.G., Shurygina I.A.* Compounds, pharmaceutical compositions and a method for the prophylaxis and treatment of the adhesion process. *WO patent N2012156938*, 2012.
8. *Шурыгина И.А., Аюшинова Н.И., Чепурных Е.Е., Шурыгин М.Г.* Способ профилактики спаечной болезни брюшной полости. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2017. – № 10 (146). – С. 83–87.  
*Shurygina I. A., Ayushinova N. I., Chepurnyh E. E., Shurygin M. G.* Method of prevention of abdominal cavity adhesive disease. *Experimental & clinical gastroenterology*. 2017, vol. 146, no.10, pp. 83–87.
9. *Аюшинова Н.И., Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Лепехова С.А., Балыкина А.В., Малгатаева Е.Р., Попова А.Д., Янкевич С.А.* Экспериментальная модель для разработки способов профилактики спаечного процесса в брюшной полости. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. – 2012. – Т. 109, № 2. – С. 51–53.  
*Ayushinova N. I., Shurygina I. A., Shurygin M. G., et al.* Eksperimental'naya model' dlya razrabotki sposobov profilaktiki spaechnogo processa v bryushnoj polosti [Experimental model for developing of ways to prevent adhesions in the abdominal cavity]. *Siberian Medical Journal (Irkutsk)*. 2012, vol. 109, no. 2, pp. 51–53.