

УДК 616.74-001.4-092.9:611.018.23

# Влияние блокатора p38 MAPK на дифференцировку фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца

Шурыгина И.А., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б., Шурыгин М.Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Иркутский научный центр хирургии и травматологии». 664003, Иркутск, ул. Борцов Революции, д. 1

**Цель исследования:** оценить влияние блокатора p38 MAPK SB203580 на дифференцировку фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца. **Материалы и методы:** На модели линейной кожно-мышечной раны у крыс линии Вистар оценено влияние локального введения блокатора p38 MAPK SB203580 в составе лекарственной пленки на дифференцировку фибробластов ( $n = 30$ ) по сравнению с заживлением раны без введения активного вещества ( $n = 30$ ). Проводили оценку количества коллагена в области раны, периоперационной зоне и интактной дерме, а также иммуноморфологическое окрашивание на CD34, CD45, MMP9 и актин в сроки от 2 часов до 30 суток. **Результаты:** Установлено, что применение блокатора p38 SB203580 приводило к значительному снижению интенсивности коллагенообразования в зоне формирующегося рубца. Так, у животных контрольной группы относительная площадь, занятая волокнами коллагена в зоне послеоперационной раны, закономерно возрастала в сроки от 3 до 30 суток, достигая максимальных значений к концу наблюдения — 73,54% [66,87; 78,01]. При введении SB203580 в течение всего срока наблюдения отмечалось достоверное снижение коллагенообразования в сравнении с группой контроля, к 30 суткам показатель составил 43,60% [41,05; 60,15] ( $p = 0.002$ ). Введение SB203580 снижало привлечение прогениторных клеток фибробластического ряда в зону формирования послеоперационного рубца, повышало фиброкластическую активность.

**Ключевые слова:** раневой процесс, послеоперационный рубец, p38 MAPK, SB203580, прогениторные клетки, MMP9.

**Для цитирования:** Шурыгина И.А., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б., Шурыгин М.Г. Влияние блокатора p38 MAPK на дифференцировку фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца. Патогенез. 2018; 16(2): 43–47

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.02.43-47

**Адрес для переписки:** Шурыгина Ирина Александровна, e-mail: irinashurygina@gmail.com

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках НИР 01201280990.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

**Поступила:** 15.02.2018

## Effects of p38 MAPK inhibitors on fibroblast differentiation in the zone of postoperative scar formation

Shurygina I.A., Zelenin N.V., Granina G.B., Shurygin M.G.

Irkutsk Scientific Center for Surgery and Traumatology, Bortsov Revolyutsii Str. 1, Irkutsk 664003, Russian Federation

**Aim.** To assess effects of a p38 MAPK inhibitor, SB203580, on fibroblast differentiation in the zone of postoperative scar formation. **Materials and methods.** The effect of locally injected p38 MAPK inhibitor, SB203580, on fibroblast differentiation ( $n = 30$ ) was compared with wound healing without an active substance injection ( $n = 30$ ) on a model of linear musculocutaneous wound in Wistar rats weighing 220-250 g. We measured the amount of collagen in the wound zone, perioperative zone, and intact derma and conducted immunomorphological staining for CD34, CD45, MMP9, and actin at timepoints of 2 hours to 30 days. **Results.** The p38 inhibitor, SB203580, induced a significant decrease in collagenation intensity in the zone of forming scar. In Wistar rats of the control group, the percent area of collagen fibers in the zone of postoperative wound was increasing between days 3 and 30 and reached a maximum of 73.54 % [66.87; 78.01] by the end of observation period. The SB203580 injection significantly decreased collagenation over the entire period of observation compared with the control group (43.60 % [41.05; 60.15] by day 30,  $p = 0.002$ ). The SB203580 injection decreased the engagement of fibroblastic progenitors in the zone of postoperative scar formation and increased the fibroblast activity.

**Key words:** wound process; postoperative scar; p38 MAPK; SB203580; progenitors; MMP9.

**For citation:** Shurygina I.A., Zelenin N.V., Granina G.B., Shurygin M.G. [Effects of p38 MAPK inhibitors on fibroblast differentiation in the zone of postoperative scar formation]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(2): 43–47 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.02.43-47

*For correspondence: Shurygina Irina Alexandrovna, e-mail: irinashurygina@gmail.com*

*Funding. This work was performed with support from the Federal Agency for Scientific Organizations under Contract 01201280990.*

*Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.*

*Received: 15.02.2018*

## Введение

Репаративный процесс после различных повреждений у людей протекает с активным вовлечением соединительнотканного компонента. Однако не всегда рост соединительной ткани соответствует регенераторным потребностям, создавая проблемы низкой скорости заживления ран при недостатке пролиферативного потенциала, или приводя к формированию грубых рубцов при избыточном росте.

По нашему мнению, одним из перспективных способов влияния на рост соединительной ткани может стать воздействие на компоненты внутриклеточных сигнальных каскадов. При этом в качестве мишеней могут выступать белки, обеспечивающие передачу сигналов с мембранных рецепторов в ядро клетки.

При анализе патогенеза раневого процесса нами было обращено внимание на то, что практически все стимулы, инициирующие репарацию при раневом процессе, реализуются через систему каскадов MAP-киназ, обеспечивающих связь между стимуляцией рецепторного поля клетки и активацией экспрессии генов, запускающих процессы пролиферации, дифференцировки и синтеза внеклеточного вещества [1, 2].

Так, после воздействия митогенов на рецепторы клеточной мембраны начинают развиваться MAPK-каскады реакций фосфорилирования протеинкиназ и других регуляторных белков, в результате чего обеспечивается передача полученного сигнала в ядро клетки. А это, в свою очередь, приводит к активации или подавлению активности определенных генов. В результате запускаются воспалительный ответ, апоптоз, деление клеток и т.д. [3].

Управление активностью MAP-киназ может привести к появлению новых возможностей для лечения ран и профилактики послеоперационных осложнений.

В связи с этим нами была поставлена цель оценить влияние блокатора p38 MAPK SB203580 на дифференцировку фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца.

## Материалы и методы

На модели линейной кожно-мышечной раны (крысы самцы Вистар в возрасте 9 месяцев, весом 220—250 г) изучали влияние блокатора p38 MAPK на функциональную активность клеток фибробластического ряда в зоне репарации. Эксперимент выполнялся в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) согласно протоколу, одобренному Комитетом по биомедицинской этике Иркутского научного центра хирургии и травматологии.

В области грудной клетки паравертебрально наносили рану до собственной фасции длиной 5 см (в качестве наркотика использовали кетамин 25 мг/кг, дроперидол 1,25 мг/кг и атропин 0,2 мг/кг). В рану вводили перфорированную пластину на основе желатина, изготовленную

по разработанной нами методике [4]. Контрольной группе животных вводили пластину без активного вещества (30 животных), опытной — с блокатором p38 MAP-киназы SB203580 (Tocris bioscience, кат. № 1202 Bath № 4 A/95665), причем пластина обеспечивала медленную резорбцию активного ингредиента (30 животных). Для сопоставления краёв раны накладывали швы.

Выведение животных из эксперимента проводили в сроки 2, 6, 12 часов, 1, 3 суток (по 3 животных в группе) и 7, 14, 30 суток (по 5 животных в группе). Фрагменты кожи, мышцы и подкожной клетчатки из зоны повреждения фиксировали раствором FineFix (Milestone, Италия) для последующего гистологического исследования (окраска по Ван-Гизон, оценка количества коллагена в области раны, интактной дерме и зоне, прилегающей к ране, разработанном нами способом [5] на 3, 7, 14, 30 сутки), и иммуноморфологического исследования (с 2 часов до 30 суток).

Для оценки дифференцировки фибробластов в зоне повреждения проведено их фенотипирование. С этой целью иммуноморфологическими методами произведено мечение различных форм фибробластов на экспрессию CD34 как маркера прогениторных клеток, CD45 как маркера клеток костномозгового происхождения, MMP-9 — матриксной металлопротеазы-9 как маркера фиброblastического звена, и актина для идентификации миофибробластов. Для иммуноморфологических исследований в качестве первичных антител применяли:

- CD34 (ICO 115) monoclonal IgG (Mouse) (Santa Cruz, Cat. N Sc-7324, Lot C 0909) (иммуногистохимическое, иммунофлюоресцентное окрашивание);
- MMP-9 monoclonal antibody IgG (Rabbit) (Epitomics, Cat. N 2551-1, Lot YG 113001P) (иммунофлюоресцентное окрашивание);
- CD45 (OX 30) monoclonal IgG (Mouse) (Santa Cruz, Cat. N Sc-53047, Lot B 2409) (иммунофлюоресцентное окрашивание);
- Actin monoclonal antibody (Rabbit) (Epitomics, Cat. N 1844-1, Lot D 091805), (иммуногистохимическое окрашивание).

Коэкспрессию CD34<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup> оценивали методом двойного иммунофлюоресцентного мечения, используя вторичные антитела Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Cat. N A-11029, Lot 898236), и Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Cat. N A-11031, Lot 822389), докрашивание ядер проводили Dapi (Biotium, Cat. N 40011, Lot 8D 0605).

На гистологических препаратах, окрашенных по Ван-Гизон, фотографировали область формирования послеоперационного рубца, дерму, прилегающую к зоне репарации и интактную дерму. Измеряли относительную площадь, занимаемую коллагеновыми волокнами. Для каждого случая проводилось не менее 10 измерений. На 30-е сутки измеряли ширину сформированного рубца. Поскольку в исследовании присутствовали выборки, закон распределения числовых показателей в которых отличался от нормального (по данным проверки при помощи критерия Колмогорова—Смирнова), достоверность различий изучаемых признаков проверяли при помощи

Относительная площадь (%), занятая волокнами коллагена в зоне формирующегося рубца в контроле и при подавлении активности p38 MAP-киназы

Срок	Контрольная группа			Введение SB203580			z	p
	Me	25%	75%	Me	25%	75%		
3 сут.	11,57	8,53	27,85	4,53	0,89	9,81	2,49	0,011
7 сут.	25,21	15,61	36,92	1,78	1,09	2,8	5,2	<0,001
14 сут.	55,41	41,10	74,38	31,54	23,15	40,24	4,49	<0,001
30 сут.	73,54	66,87	78,01	43,60	41,05	60,15	3,14	0,002

Примечание. Указана статистическая значимость межгрупповых различий на соответствующем сроке обследования

непараметрического U-критерия Манна—Уитни, данные приведены в виде медианы и квартилей (Me [25%; 75%]). Анализ данных проводили с использованием статистического пакета g-projekt.

### Результаты

Как известно, оценка синтетической активности фибробластов проводится по продукции ими специфического белка — коллагена. Нами изучена функциональная активность фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца в фибробластическую фазу воспаления. Исследования проводились на гистологических препаратах, окрашенных по Ван-Гизон, при этом оценивалась относительная площадь, занимаемая коллагеновыми волокнами [5].

Установлено, что у животных контрольной группы относительная площадь, занятая волокнами коллагена в зоне послеоперационной раны, закономерно возрастала в сроки от 3 до 30 суток, достигая максимальных значений к концу наблюдения. При этом в дерме рядом с травматическим повреждением плотность коллагена достоверно нарастала к 14-м суткам ( $p = 0,029$ ), а в интактной дерме изменений плотности волокон не наблюдалось.

Применение блокатора p38 SB203580 приводило к значительному снижению интенсивности коллагенообразования в зоне формирующегося рубца. Пролиферация фибробластов в процессе заживления раны развивалась с 3-х суток. И в течение всего последующего наблюдения отмечалось достоверно более низкое коллагенообразование в сравнении с группой контроля (таблица). Так, на 3 сутки коллагенообразование в области раны практически отсутствовало. В итоге к концу наблюдения (30 сутки) у животных с введением SB 203580 количество коллагена в ране было в 2 раза ниже, чем в контроле.

Таким образом, локальное подавление активности p38 MAP-киназы снижало синтетическую активность фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца.

При изучении процесса репарации в области послеоперационного рубца у животных контрольной группы установлено, что с начала фибробластической фазы воспаления большинство фибробластов на 3 сутки имеют признаки дедифференцировки, интенсивно экспрессируя CD34. В последующем их пролиферативный потенциал снижался и к 7 суткам только небольшое число клеток имели слабое специфическое окрашивание на CD34. Позднее специфическое окрашивание выявить не удалось. Аналогичный процесс зарегистрирован при локальном введении ингибитора p38 MAPK. Это свидетельствует

о том, что блокада p38 MAPK не снижает активацию митогенного потенциала фибробластических клеток, стимулированную раневым процессом.

Наличие в зоне формирования послеоперационного рубца прогениторных клеток фибробластического ряда, имеющих фенотип CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> [6], у животных контрольной группы зарегистрировано только в срок 7 суток (рис. 1). В группе с введением блокатора p38 такое сочетание маркеров не зарегистрировано в течение всего срока наблюдения.

Выявление в зоне формирования рубца миофибробластов определяли по наличию положительной окраски на актин. Установлено, что как у животных контрольной группы, так и при введении блокатора p38 MAPK окрашивалось только небольшое число клеток на 3-и и 7-е сутки раневого процесса.

Наличие в зоне формирования рубца фиброкластов детектировали по специфическому окрашиванию на MMP-9 клеток фибробластического ряда [7]. У животных контрольной группы такие клетки в зоне рубца обнаружены только на 7-е сутки (рис. 2). В группе с применением блокатора p38 клетки с такими маркерами фиксировались на 3-и и 7-е сутки после моделирования послеоперационного рубца и характеризовались высокой интенсивностью специфического свечения (рис. 3).

Применение блокатора p38 MAPK позволило изменить характеристики сформированного рубца. У живот-

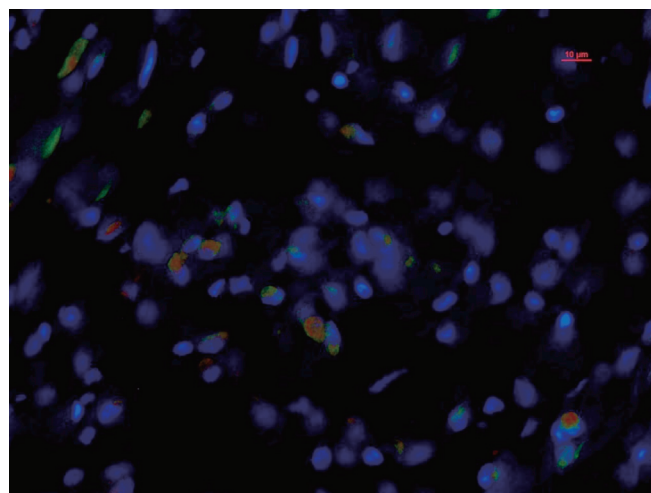


Рис. 1. Контрольная группа, 7 суток. CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клетки в зоне образования послеоперационного рубца. Иммунофлюоресценция, первичные антитела — CD34 (Santa cruz), вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 488, первичные антитела CD45 (Santa cruz), вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 568, докрасивание ядер Dapi.





Рис. 2. Контрольная группа, 7 суток. Единичные фиброциты в зоне формирования послеоперационного рубца. Иммунофлуоресценция, первичные антитела к MMP9 (Epitomics), вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 488

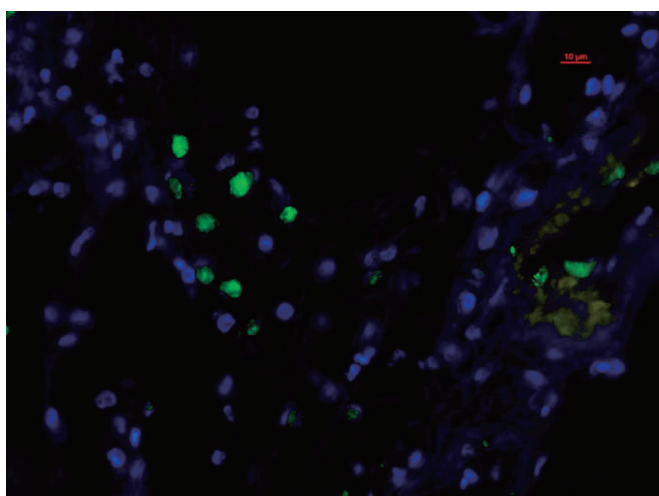


Рис. 3. Группа с блокадой p38 MAPK-киназного каскада, 7 суток. Ярко светящиеся фиброциты, экспрессирующие MMP9 в зоне образования послеоперационного рубца. Иммунофлуоресценция, первичные антитела к MMP9 (Epitomics), вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 488, докрашивание ядер Dapi.

ных при применении блокатора p38 MAPK ширина сформированного рубца на 30 сутки составляла 157,8 [120,11; 206,45] мкм, в то время как у животных контрольной группы — 763,47 [334,1; 1285,31] мкм. Различия достоверны по критерию Манна—Уитни:  $z = 6,073$ ,  $p < 0,001$ .

### Обсуждение

Наше исследование подтвердило мнение, что при естественном течении репаративного процесса, а также при подавлении активности p38 MAPK основным источником фибробластов являются малодифференцированные фибробласты, пролиферирующие после повреждающего воздействия [8]. Прогениторные клетки фибробластического ряда также вносят свой вклад в репарацию при естественном течении, а появление данных клеток в зоне повреждения ограничено сроком 7 суток. В то же время локальное подавление активности p38 MAPK снижает хоуминг данных клеток в зону повреждения.

Антифибротический эффект блокатора p38 SB203580 согласуется с наблюдением [9]. Авторы обнаружили, что применение данного блокатора на культуре фибробластов снижает экспрессию коллагенов I и III типов.

Важную роль в формировании и созревании соединительной ткани играет перестройка рубцовой ткани, в частности под действием ферментов — металлопротеаз. За-регистрированная нами активизация фиброкластической активности при локальном подавлении p38 MAPK, несомненно, вносит существенный вклад в ремоделирование формирующейся соединительной ткани. В итоге достигается изменение характеристик рубца в сторону формирования узкого малозаместного рубца.

### Заключение

Таким образом, локальное введение блокатора p38 MAPK снижает привлечение прогениторных клеток фибробластического ряда в зону формирования послеоперационного рубца, повышает фиброкластическую активность, а также значительно снижает интенсивность коллагенообразования в области формирования рубца. Снижение привлечения в зону прогениторных клеток при блокаде p38 MAPK, по-видимому, закономерно и противоположно действию, оказываемому при воздействии на зону повреждения активаторами MAPK, в частности вазоэндотелиальным фактором роста [10].

Управление формированием послеоперационного рубца за счет воздействия на активность p38 MAPK-киназы открывает новые перспективы для получения рубцовой ткани с заданными характеристиками, улучшения эстетических свойств послеоперационного рубца.

### Список литературы

1. Kyriakis J.M., Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol. Rev.* 2012; 92(2): 689-737. DOI: 10.1152/physrev.00028.2011
2. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б. Роль MAP-киназных механизмов в регуляции клеточного роста. *Сибирский медицинский журнал.* 2009; 6: 36-40.
3. Atay O., Skotheim J.M. Spatial and temporal signal processing and decision making by MAPK pathways. *J. Cell Biol.* 2017; 216(2): 317-330. DOI: 10.1083/jcb.201609124
4. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. *Лекарственная пленка пролонгированного действия, способ изготовления и способ её применения.* Патент РФ 2445074; 2012.
5. Шурыгин М.Г., Дремина Н.Н., Шурыгина И.А., Мачхин И.Н., Антипина С.Л. *Способ определения относительной площади волокон коллагена в гистологическом препарате.* Патент РФ 2332665; 2008.
6. Bellini A., Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibrosis. *Lab. Invest.* 2007; 87: 858-870. DOI: 10.1038/labinvest.3700654
7. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н., Кая О.В. Матриксная металлопротеаза 9 и ремоделирование при инфаркте миокарда. *Acta Biomedica Scientifica.* 2013; 90 (2-1): 138-141.
8. Postlethwaite A.E., Shigemitsu H., Kanangat S. Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2004; 16: 733-738.
9. Li Y., Zhang W., Gao J., Liu J., Wang H., Li J., Yang X., He T., Guan H., Zheng Z., Han S., Dong M., Han J., Shi J., Hu D. Adipose tissue-derived stem cells suppress hypertrophic scar fibrosis via the p38/MAPK signaling pathway. *Stem Cell Res. Ther.* 2016; 7(1):102. DOI: 10.1186/s13287-016-0356-6
10. Shurygin M.G., Shurygina I.A., Dremina N.N., Kanya O.V. Endogenous progenitors as the source of cell material for ischemic damage repair in experimental myocardial infarction under conditions of changed concentration of vascular endothelial growth factor. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015; 158 (4): 528-531. DOI: 10.1007/s10517-015-2801-4

## References

1. Kyriakis J.M., Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol. Rev.* 2012; 92(2): 689-737. DOI: 10.1152/physrev.00028.2011
2. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Zelenin N.V., Granina G.B. [Role of MAP-kinase mechanisms in the regulation of cell growth (review)]. *Sibirskii Medicinskii Journal [Siberian Medical Journal]*. 2009; 89(6): 36-40. (in Russian).
3. Atay O., Skotheim J.M. Spatial and temporal signal processing and decision making by MAPK pathways. *J. Cell Biol.* 2017; 216(2): 317-330. DOI: 10.1083/jcb.201609124
4. Shurygin M.G., Shurygina I.A. [Prolonged-release medicated film, method for preparing and applying it]. Patent 2445074, RF; 2012.
5. Shurygin M.G., Dremina N.N., Shurygina I.A., Machkhin I.N., Antipina S.L. [Method of defining comparative collagen fibre area in histological preparation]. Patent 2332665, RF; 2008.
6. Bellini A., Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab. Invest.* 2007; 87: 858-870. DOI: 10.1038/labinvest.3700654
7. Shurygin M.G., Shurygina I.A., Dryomina N.N., Kanya O.V. [Matrix metalloproteinase 9 and remodeling after myocardial infarction]. *Acta Biomedica Scientifica*. 2013; 90(2-1): 138-141. (in Russian)
8. Postlethwaite A.E., Shigemitsu H., Kanangat S. Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2004; 16: 733-738.
9. Li Y., Zhang W., Gao J., Liu J., Wang H., Li J., Yang X., He T., Guan H., Zheng Z., Han S., Dong M., Han J., Shi J., Hu D. Adipose tissue-derived stem cells suppress hypertrophic scar fibrosis via the p38/MAPK signaling pathway. *Stem Cell Res. Ther.* 2016; 7(1):102. DOI: 10.1186/s13287-016-0356-6
10. Shurygin M.G., Shurygina I.A., Dremina N.N., Kanya O.V. Endogenous progenitors as the source of cell material for ischemic damage repair in experimental myocardial infarction under conditions of changed concentration of vascular endothelial growth factor. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015; 158 (4): 528-531. DOI: 10.1007/s10517-015-2801-4

### Сведения об авторах:

Шурыгина Ирина Александровна — доктор медицинских наук, профессор РАН, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией функциональной морфологии и патофизиологии клетки Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»

Зеленин Николай Вадимович — аспирант Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»

Гранина Галина Борисовна — кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии и патофизиологии клетки Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»

Шурыгин Михаил Геннадьевич — доктор медицинских наук, заведующий научно-лабораторным отделом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»