

УДК 616.74-003.93

Влияние p38 MAPK на окислительное фосфорилирование при регенерации мышечной ткани

Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Иркутский научный центр хирургии и травматологии».

664003, Иркутск, ул. Борцов Революции, д. 1

Цель исследования: определить влияние блокады p38 MAPK на систему окислительного фосфорилирования при репарации мышечной ткани. **Материалы и методы:** Контрольной группе животных ($n = 21$) наносили рану длиннейшей мышцы спины, в рану вносили лекарственную плёнку без активного вещества, основной группе ($n = 21$) плёнку с блокатором p38 MAP-киназы SB 203580. Выведение из эксперимента осуществляли на 1, 3, 7, 14 и 30 сутки. При гистологическом исследовании подсчитывали количество миосателлитов и количество образующихся «мышечных почек» в поле зрения в зоне травмы. Иммунофлюоресцентным методом изучали активность экспрессии OхPhos Complex IV. **Результаты.** Установлено, что блокада p38 MAPK каскада при помощи локального введения активного вещества в составе лекарственной пленки позволила «затормозить» деление миосателлитов в ранние сроки репаративного процесса, обусловила позднее начало образования «мышечных» почек в зоне регенерации – на 7 сутки в сравнение с 3 сутками в контрольной группе, а также привела к резкому усилению окислительного фосфорилирования в зоне регенерации мышечной ткани.

Ключевые слова: раневой процесс; p38 MAPK; SB203580; миосателлиты; окислительное фосфорилирование; Oхphos.

Для цитирования: Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г. Влияние p38 MAPK на окислительное фосфорилирование при регенерации мышечной ткани. Патогенез. 2018; 16(4): 66-70

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.66-70

Для корреспонденции: Шурыгина Ирина Александровна, e-mail: irinashurygina@gmail.com

Финансирование. Исследование выполнено в рамках НИР 01201280990. Исследование проведено с применением оборудования ЦКП «Диагностические изображения в хирургии».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила: 27.08.2018

Effect of p38 MAPK on oxidative phosphorylation in regeneration of muscle tissue

Shurygina I.A., Shurygin M.G.

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

Summary. The aim of the study was to determine the effect of p38 MAPK inhibition on the oxidative phosphorylation system during repair of muscle tissue. **Materials and methods.** In the control animal group ($n = 21$), a wound was inflicted on the longest back muscle; then a medicinal film free of active substance was applied to the wound. In the main group ($n = 21$), the applied film contained a p38 MAP-kinase inhibitor, SB 203580. The animals were euthanized on days 1, 3, 7, 14, and 30. In the histological study, the number of myosatellite cells per field of view was counted in the trauma zone. The immunofluorescence method was used to study the intensity of OхPhos Complex IV expression. **Results.** Inhibition of the p38 MAPK cascade by local administration of the active substance formulated into the medicated film allowed «putting the brakes» on division of myosatellite cells during the early reparative process, on day 7 vs. day 3 in the control group, and also resulted in a sharp increase in oxidative phosphorylation in the regeneration zone of muscle tissue.

Key words: wound process; p38 MAPK; SB203580; myosatellite cell; oxidative phosphorylation; Oхphos.

For citation: Shurygina I.A., Shurygin M.G. [Effect of p38 MAPK on oxidative phosphorylation in regeneration of muscle tissue]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(4): 66-70 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.66-70

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. The study was carried out using the equipment of the CCE «Diagnostic Imaging in Surgery».

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

Received: 27.08.2018

Введение

Митохондриальное окислительное фосфорилирование (OхPhos) имеет важное значение для функционирования клеток и их выживания. OхPhos у млекопитающих обеспечивает более чем 90% энергии клетки. Цитохром С и цитохром С оксидаза представляют терминальное звено электрон-транспортной цепи [1, 2].

В настоящее время предполагают, что митохондриальная дисфункция наблюдается при большом числе заболеваний человека, в том числе при наиболее распространенных патологиях, таких как сахарный диабет, рак, ишемическая болезнь сердца, инсульт [3, 4]. По-видимому, эти болезни, не относящиеся традиционно к митохондриальной патологии, могут быть луч-

ше понятия, если рассматривать их в свете изменения активности сигнальных путей и регуляторных механизмов, которые часто страдают при этих патологиях. Недавние исследования позволили выявить связь между клеточной сигнализацией и OxPhos, и уже установлено более 20 сайтов фосфорилирования, которые связаны с комплексами OxPhos [5]. Было определено, что несколько сигнальных путей в качестве цели имеют и цитохром С оксидазу, включая протеинкиназы А и С, тирозинкиназные рецепторы и воспалительные сигналы [1]. В то же время тирозинкиназные рецепторы осуществляют прием клеткой сигналов от факторов роста, и таким образом определяют степень пролиферации, способность и направление дифференцировки клеток в ответ на изменение клеточного окружения [6, 7].

Цель исследования: определить влияние блокады p38 MAPK на систему окислительного фосфорилирования при репарации мышечной ткани.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проведен на 42 самцах крыс линии Wistar, у которых изучали местное действие блокатора p38 MAP-киназы на регенерацию поперечно-полосатой мышцы. Вес животных составлял 220-250 г, а возраст – 9 месяцев. Животные содержались в стандартных условиях вивария без ограничения доступа к воде и пище. Содержание и экспериментальные действия с животными осуществляли по правилам, которые были приняты Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986). Исследование одобрено комитетом по этике ИНИЦХТ.

Животные были разделены на две группы по 21 животному:

1) контрольная (нанесение раны длиннейшей мышцы спины, внесение в рану лекарственной плёнки без активного вещества [8].

2) основная – изучение воздействия блокатора p38 MAP-киназы SB 203580 (Tocris bioscience, кат. № 1202 Bath № 4 А/95665) на заживление раны (нанесение раны, введение в рану блокатора p38 MAP-киназы в составе лекарственной плёнки).

Выведение из эксперимента осуществляли на 1-е, 3-и (по 3 животных в группе), 7-е, 14-е и 30-е сутки (по 5 животных в группе). Для исследования забирали ткани из области раны, фиксировали раствором FineFix (Mile-

stone, Италия) для последующего гистологического исследования.

Препараты фотографировали (не менее 10 образцов на каждый срок у 1 животного, не менее 3 зон), подсчитывали количество миосателлитов и количество образующихся «мышечных почек» в поле зрения в зоне травмы при увеличении $\times 400$. Проводили дисперсионный анализ breakdown ANOVA с тестом Levene на нормальность распределения. Так как распределение во всех группах отличалось от нормального, значимость различий рассчитывали с помощью критерия Mann-Whitney.

Для изучения системы anti-OxPhos применен иммунофлюоресцентный метод с использованием в качестве первичных антител anti-OxPhos Complex IV subunit I monoclonal antibody (Invitrogen, Cat. N D 0589, Lot 459600), рабочее разведение 1:200. Ядра докрашивали DAPI (Biotium, Cat. N 40011, Lot 8D 0605). Визуализацию специфического свечения флюорохромных меток проводили на исследовательском микроскопе Nikon Eclipse 80i с приставкой для эпифлюоресценции DIH-M. Сведение каналов выполняли в программе NIS-Elements BR Analysis 4.00.00 64-bit.

Результаты исследования

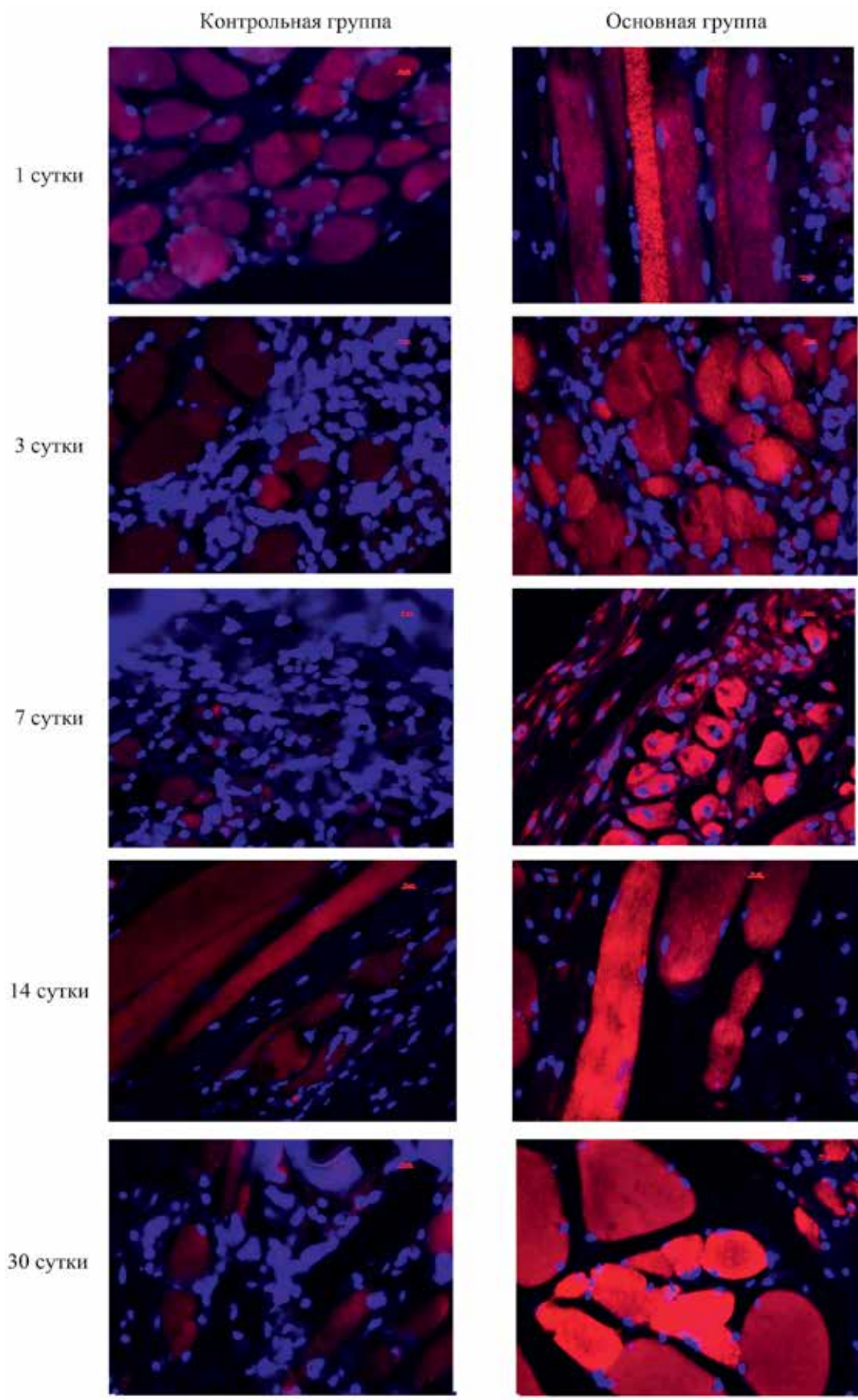
Как известно, регенерация мышцы достигается за счет деления миосателлитов [9-12]. При гистологическом исследовании установлено, что у контрольной группы животных единичные делящиеся миосателлиты зарегистрированы на 3-и сутки, максимальная интенсивность деления миосателлитов и образования мышечных почек в зоне травмы мышцы отмечена на 14-е сутки, к 30-м сохранялись единичные делящиеся клетки. В основной группе единичные мышечные почки отмечены на 7-е сутки, пик интенсивности регенерации мышцы приходится на 14-е сутки. На 30-е сутки деления миосателлитов не зарегистрировано (таблица).

При оценке системы окислительного фосфорилирования обращали внимание на интенсивность окраски, равномерность ее распределения.

Установлено, что у животных контрольной группы наблюдалась низкоинтенсивная окраска в зоне регенерации мышечной ткани с легкой неравномерностью окраски на 1-е, 7-е и 14-е сутки. В основной группе окраска во все исследуемые сроки была яркой, с выраженной глыбчатостью и неравномерностью окраски на 1-е, 14-е и 30-е сутки. При этом ярко окрашены отдельные митохондрии (рисунок). В зоне интактной мышцы в основ-

Сравнение регенерации мышцы в исследуемых группах

Срок (сутки)	Количество мышечных почек			Количество миосателлитов		
	Контрольная группа, Me [min-max]	Основная группа, Me [min-max]	<i>p</i>	Контрольная группа, Me [min-max]	Основная группа, Me [min-max]	<i>p</i>
1	0 [0-0]	0 [0-0]	–	0 [0-0]	0 [0-0]	–
3	0,11 [0-2]	0 [0-0]	0,30	0,39 [0-7]	0 [0-0]	0,30
7	0,11 [0-1]	0,03 [0-1]	0,21	0,30 [0-3]	0,09 [0-3]	0,22
14	0,43 [0-3]	1,06 [0-5]	0,29	2,11 [0-16]	6,11 [0-36]	0,28
30	0,24 [0-3]	0 [0-0]	0,51	0,67 [0-8]	0 [0-0]	0,51



Окраска в зоне травмы мышцы на OxPhos Complex IV (Invitrogen), докрасивание ядер DAPI. Иммунофлюоресценция.

ной группе окраска была минимальной без выраженной неравномерности.

Обсуждение

Как известно, митогенактивируемые протеинкиназы принимают участие в регуляции деления клеток и апоптоза [6]. В доступной литературе обсуждаются вопросы участия MAPK механизмов в регуляции репарации мышечной ткани. В частности, доказано участие p38 [13, 14] в передаче сигналов к дифференцировке.

Считают, что активация p38 MAPK в миогенных клетках-предшественниках является ключевым сигналом для их выхода из клеточного цикла, и перехода пролиферирующих миосателлитных клеток к терминальной дифференцировке с экспрессией мышечноспецифичных генов: у данных клеток наблюдается снижение экспрессии Pax7, активация миогенных факторов транскрипции MyoD и Mef2. Таким образом, идентификация сигнального механизма, который активирует p38 MAPK во время этого процесса имеет важное значение для понимания механизма регуляции регенерации мышц [15-17].

Нами ранее было показано, что при травме поперечно-полосатой мышцы фосфорилированная (активная) форма p38 MAPK присутствует в единичных миосателлитах с 3 по 9 сутки после травмы, что соответствует периоду активации и пролиферации миосателлитов [18]. Соответственно, блокада p38 MAPK каскада при помощи локального введения активного вещества в составе лекарственной пленки позволила «затормозить» деление миосателлитов в ранние сроки репаративного процесса, обусловила позднее начало образования «мышечных» почек в зоне регенерации – на 7-е сутки в сравнение с 3-ми сутками в контрольной группе. Кроме того, данное воздействие усиливало окислительное фосфорилирование в миоцитах в области травматического воздействия.

Заключение

По-видимому, влияние на систему окислительно-фосфорилирования является одним из механизмов воздействия блокаторов p38 MAPK при регенерации мышечной ткани. С учетом диссоциации активности OxPhos и регенерации эти процессы не являются тесно взаимосвязанными, но входят в сферу влияния p38 MAPK каскада.

Список литературы

1. Hüttemann M., Lee I., Grossman L.I., Doan J.W., Sanderson T.H. Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 748: 237-264. DOI: 10.1007/978-1-4614-3573-0_10
2. Mahapatra G., Varughese A., Ji Q., Lee I., Liu J., Vaishnav A., Sinkler C., Kapralov A.A., Moraes C.T., Sanderson T.H., Stemmler T.L., Grossman L.I., Kagan V.E., Brunzelle J.S., Salomon A.R., Edwards B.F., Hüttemann M. Phosphorylation of Cytochrome c Threonine 28 Regulates Electron Transport Chain Activity in Kidney: IMPLICATIONS FOR AMP KINASE. *J. Biol. Chem.* 2017; 292(1): 64-79. DOI: 10.1074/jbc.M116.744664
3. Судаков Н.П., Никифоров С.Б., Невинский Г.А., Константинов Ю.М., Новикова М.А. Роль митохондриальной дисфункции в

патогенезе социально-значимых заболеваний. *Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология.* 2008; 1(2): 11-14.

4. Lee I., Hüttemann M. Energy crisis: the role of oxidative phosphorylation in acute inflammation and sepsis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1842(9): 1579-1586. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.05.031
5. Hüttemann M., Lee I., Samavati L., Yu H., Doan J.W. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1773(12): 1701-1720.
6. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б. Роль MAP-киназных механизмов в регуляции клеточного роста (обзор литературы). *Сибирский медицинский журнал.* 2009; 89(6): 36-40.
7. 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; 6(2): 232-237. DOI:10.1007/s11705-012-1286-1
8. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. *Лекарственная пленка пролонгированного действия, способ изготовления и способ её применения.* Патент РФ 2445074; 2012.
9. Шурыгин М.Г., Болбат А.В., Шурыгина И.А. Миосателлиты как источник регенерации мышечной ткани. *Фундаментальные исследования.* 2015; 1-8: 1741-1746.
10. Fukada S.I. The roles of muscle stem cells in muscle injury, atrophy and hypertrophy. *J. Biochem.* 2018; 163(5): 353-358. DOI: 10.1093/jb/mvy019
11. Hwang A.B., Brack A.S. Muscle Stem Cells and Aging. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2018; 126: 299-322. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2017.08.008
12. Yusuf F., Brand-Saber B. Myogenesis and muscle regeneration. *Histochem. Cell Biol.* 2012; 138(2): 187-99. DOI: 10.1007/s00418-012-0972-x
13. de Angelis L., Zhao J., Andreucci J.J., Olson E.N., Cossu G., McDermott J.C. Regulation of vertebrate myotome development by the p38MAPK-kinase-MEF2 signaling pathway. *Dev. Biol.* 2005; 283: 171-179. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.04.009
14. Ruiz-Bonilla V., Perdiguero E., Gresh L., Serrano A.L., Zamora M., Sousa-Victor P., Jardí M., Wagner E.F., Muñoz-Cánoves P. Efficient adult skeletal muscle regeneration in mice deficient in p38beta, p38gamma and p38delta MAP kinases. *Cell Cycle.* 2008; 7(14): 2208-2214. DOI: 10.4161/cc.7.14.6273
15. Li Y.P., Niu A., Wen Y. Regulation of myogenic activation of p38 MAPK by TACE mediated TNF α release. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2014; 2: 21. DOI: 10.3389/fcell.2014.00021
16. Lluís F., Perdiguero E., Nebreda A.R., Muñoz-Cánoves P. Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAPK kinases. *Trends Cell Biol.* 2006; 16(1): 36-44. DOI:10.1016/j.tcb.2005.11.002
17. Xiao F., Wang H., Fu X., Li Y., Wu Z. TRAF6 promotes myogenic differentiation via the TAK1/p38 mitogen-activated protein kinase and Akt pathways. *PLoS One.* 2012; 7(4): e34081. DOI:10.1371/journal.pone.0034081
18. Шурыгина И.А., Дремина Н.Н., Шаульская Е.С., Шурыгин М.Г. Активность митогенактивируемых сигнальных каскадов при травме поперечнополосатой мышцы. *Современные проблемы науки и образования.* 2016; 5: 145.

References

1. Hüttemann M., Lee I., Grossman L.I., Doan J.W., Sanderson T.H. Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 748: 237-264. DOI: 10.1007/978-1-4614-3573-0_10
2. Mahapatra G., Varughese A., Ji Q., Lee I., Liu J., Vaishnav A., Sinkler C., Kapralov A.A., Moraes C.T., Sanderson T.H., Stemmler T.L., Grossman L.I., Kagan V.E., Brunzelle J.S., Salomon A.R., Edwards B.F., Hüttemann M. Phosphorylation of Cytochrome c Threonine 28 Regulates Electron Transport Chain Activity in Kidney: IMPLICATIONS FOR AMP KINASE. *J. Biol. Chem.* 2017; 292(1): 64-79. DOI: 10.1074/jbc.M116.744664
3. Судakov Н.П., Никифоров С.Б., Невинский Г.А., Константинов Ю.М., Новикова М.А. [The role of mitochondrial dysfunction in socially significant diseases pathogenesis]. *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya. Ekologiya [News*

- of the Irkutsk State University. Series: Biology. Ecology]. 2008; 1(2): 11-14. (in Russian)
4. Lee I., Hüttemann M. Energy crisis: the role of oxidative phosphorylation in acute inflammation and sepsis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1842(9): 1579-1586. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.05.031
 5. Hüttemann M., Lee I., Samavati L., Yu H., Doan J.W. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1773(12): 1701-1720.
 6. 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)
 7. 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; 6(2): 232-237. DOI:10.1007/s11705-012-1286-1
 8. Shurygin M.G., Shurygina I.A. [Prolonged-release medicated film, method for preparing and applying it]. Patent 2445074, RF; 2012. (in Russian)
 9. Shurygin M.G., Bolbat A.V., Shurygina I.A. [Myogenic satellite cells as a source of muscle tissue regeneration]. *Fundamental'nye issledovaniya [Basic research]*. 2015; 1-8: 1741-1746. (in Russian)
 10. Fukada S.I. The roles of muscle stem cells in muscle injury, atrophy and hypertrophy. *J. Biochem.* 2018; 163(5): 353-358. DOI: 10.1093/jb/mvy019
 11. Hwang A.B., Brack A.S. Muscle Stem Cells and Aging. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2018; 126: 299-322. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2017.08.008
 12. Yusuf F., Brand-Saberi B. Myogenesis and muscle regeneration. *Histochem. Cell Biol.* 2012; 138(2): 187-99. DOI: 10.1007/s00418-012-0972-x
 13. de Angelis L., Zhao J., Andreucci J.J., Olson E.N., Cossu G., McDermott J.C. Regulation of vertebrate myotome development by the p38MAPkinase-MEF2 signaling pathway. *Dev. Biol.* 2005; 283: 171-179. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.04.009
 14. Ruiz-Bonilla V., Perdiguero E., Gresh L., Serrano A.L., Zamora M., Sousa-Victor P., Jardí M., Wagner E.F., Muñoz-Cánoves P. Efficient adult skeletal muscle regeneration in mice deficient in p38beta, p38gamma and p38delta MAP kinases. *Cell Cycle.* 2008; 7(14): 2208-2214. DOI: 10.4161/cc.7.14.6273
 15. Li Y.P., Niu A., Wen Y. Regulation of myogenic activation of p38 MAPK by TACE mediated TNF α release. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2014; 2: 21. DOI: 10.3389/fcell.2014.00021
 16. Lluis F., Perdiguero E., Nebreda A.R., Muñoz-Cánoves P. Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAPkinases. *Trends Cell Biol.* 2006; 16(1): 36-44. DOI:10.1016/j.tcb.2005.11.002
 17. Xiao F., Wang H., Fu X., Li Y., Wu Z. TRAF6 promotes myogenic differentiation via the TAK1/p38 mitogen-activated protein kinase and Akt pathways. *PLoS One.* 2012; 7(4): e34081. DOI:10.1371/journal.pone.0034081
 18. Shurygina I.A., Dremina N.N., Shaulskaya E.S., Shurygin M.G. [Activity of mitogen-activated signaling cascades at cross-striated muscle trauma]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya [Modern problems of science and education]*. 2016; 5: 145. (in Russian)

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»

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