

DOI: 10.29413/ABS.2018-3.5.20

УДК 616.74-003.93

Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г.

Влияние JNK MAPK на репарацию повреждённой скелетной мышцы

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»
(664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1, Россия)

Регенерация мышц после травм, а также разработка способов, стимулирующих данный процесс, является актуальной проблемой в медицине и биологии.

Цель исследования: оценить влияние локального блокирования активности митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК) группы JNK (c-Jun N-terminal kinase) на репарацию мышечной ткани.

Материалы и методы. На модели кожно-мышечной раны у крыс линии Wistar изучено влияние блокатора JNK MAPK SP600125 на репарацию мышечной ткани. Основной группе (n = 30) вводилась лекарственная пластина, содержащая SP600125 с медленным высвобождением действующего вещества, контрольной группе (n = 30) – пластина без активного вещества. Оценивалось количество делящихся миосателлитов и мышечных почек в зоне повреждения.

Результаты. Экспериментальные исследования показали, что при использовании лекарственной пластины, содержащей блокатор JNK SP600125 с медленным высвобождением действующего вещества, количество делящихся миосателлитов и формирующихся мышечных почек в зоне травмы мышцы в основной группе на 7-е, 14-е и 30-е сутки было достоверно выше (p < 0,05), чем в контрольной.

Заключение. Локальная блокада JNK MAPK в зоне повреждения мышечной ткани обеспечивает возможность стимуляции репарации поврежденной скелетной мышцы.

Ключевые слова: репарация, МАРК, JNK, мышца, SP600125

Для цитирования: Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г. Влияние JNK MAPK на репарацию поврежденной скелетной мышцы. Acta biomedica scientifica, 3 (5), 137-140, DOI 10.29413/ABS.2018-3.5.20.

Effect of JNK MAPK on the Repair of Damaged Skeletal Muscle

Shurygina I.A., Shurygin M.G.

Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology
(ul. Bortsov Revolutsii 1, Irkutsk 664003, Russian Federation)

Regeneration of muscles after injuries, as well as the development of methods that stimulate this process, is an important problem in medicine and biology.

The objective of the study was to evaluate the effect of local blocking of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity of the JNK group (c-Jun N-terminal kinase) on the repair of muscle tissue.

Materials and methods. The effect of the JNK MAPK SP600125 blocker on the repair of muscle tissue was studied on a model of a skin and muscle wound in Wistar rats. The main group (n = 30) was injected with a drug plate containing SP600125 with a slow release of the active substance, the control group (n = 30) – the plate without the active substance. The number of dividing myosatellites and muscle kidneys in the damage zone was estimated.

Results. Experimental studies have shown that when using a drug plate containing a JNK SP600125 blocker with a slow release of the active substance, the number of dividing myosatellites and forming muscle kidneys in the injury zone of the muscle in the main group on the 7th, 14th and 30th days was significantly higher (p < 0.05) than in the control.

Conclusion. Local blockade of JNK MAPK in the zone of muscle damage provides the ability to stimulate the repair of damaged skeletal muscle.

Key words: reparation, MAPK, JNK, muscle, SP600125

For citation: Shurygina I.A., Shurygin M.G. Effect of JNK MAPK on the repair of damaged skeletal muscle. Acta biomedica scientifica, 3 (5), 137-140, DOI 10.29413/ABS.2018-3.5.20.

Регенерация мышц после травм, а также разработка способов, стимулирующих данный процесс, является актуальной проблемой в медицине и биологии. В настоящее время общеизвестно, что регенерация мышцы достигается за счёт деления особых клеток – миосателлитов [4, 8, 10, 12, 13].

Известны различные средства и способы стимуляции репарации поврежденной мышечной ткани. Так, известен структурированный биоматериал Аллоплант, который используют для фиксирующей пластики при восстановлении функции поврежденной скелетной мышцы. Для этого Аллоплант в форме ленты или нити проводят через мышечное брюшко и фиксируют узловыми швами к костным или соедини-

тельно-костным опорным структурам, а также вводят в место вкола в брюшко. При этом в мышечное ложе для трансплантата осуществляют инъекции диспергированного биоматериала Аллоплант – «Стимулятор регенерации» в количестве 5–6 [2]. К недостаткам данного средства следует отнести сложность его производства, необходимость использования донорского трупного материала, нестандартность материала, риск заражения и антигенность материала.

Также для стимуляции регенерации мышечной ткани возможно применение смеси растворов рекомбинантного интерферона бета (IFN-β) в концентрации 1 × 10⁵ ЕД/мл и полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 (ПЭГ 6000) с концентрацией

$0,03 \times 10^{-9}$ моль/мл, взятых в соотношении 1 : 4 [3]. К недостаткам данного способа следует отнести использование интерферонов, которые вызывают реакцию гриппоподобного симптомокомплекса – лихорадка, озноб, боль в суставах, недомогание, потливость, головная боль или боль в мышцах, а также и реакции в месте введения – покраснение, отёк, воспаление, боль, гиперчувствительность.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить влияние локального блокирования активности митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК) группы JNK (с-Jun N-terminal kinase) на репарацию мышечной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментальной проверки гипотезы о влиянии локального введения блокаторов JNK МАРК на репарацию мышечной ткани после повреждения были изготовлены лекарственные плёнки, содержащие водные растворы желатина, агар-агара, глицерина, метилцеллюлозы, этанола [1]. В качестве субстанции лекарственного средства в состав плёнки был введён блокатор активности JNK МАР киназы SP600125. Плёнка обеспечивала медленное высвобождение блокатора JNK МАР киназы в области повреждения мышцы. Аналогично изготавливали плёнку без активного вещества, где вместо лекарственного раствора вводили физиологический раствор.

Лабораторным животным – крысам линии Wistar весом 220–250 г в возрасте 9 мес. – наносили линейную кожно-мышечную рану в области грудной клетки, паравертебрально. Длина раны составила 5 см. После остановки кровотечения основной группе животных ($n = 30$) в рану однократно вводили пластину с блокатором SP600125. Контрольной группе животных ($n = 30$) однократно вводили пластину без активного вещества. Для зашивания раны на кожу накладывали пять швов нитью пролен 4/0 (Ethicon). Через 7 суток швы снимали. Животных выводили из эксперимента в сроки от 2 часов до 30 суток.

Исследования выполняли с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (Страсбург, Франция, 1986), а также в соответствии с правилами 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). Для исследования забирали фрагмент мышечной ткани из зоны травмы для гистологического исследования, фиксировали раствором FineFix (Milestone, Италия). Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

После фиксации осуществляли проводку и заливку материала в парафиновые блоки, изготавливали серийные срезы толщиной 3 мкм. Исследования проводили методом световой микроскопии с использованием стандартных окрасок гематоксилин-эозином. Проводили фотодокументирование изображений.

Морфометрию проводили с использованием программы ImageJ Национального института здо-

ровья (США) с набором модулей для медицинской морфометрии от Wayne Rasband. Применяли планиметрический метод в модификации с использованием подсчёта элементов на 1 микрофотографии. Подсчёт морфологических элементов производили с использованием плагина «Cells counter» для «ImageJ» на микрофотографии, полученной при регистрации изображения через объектив 40× и фоторегистрирующую систему Nikon с 5 МПикс сенсором размером 2/3". При этом учитывали те объекты, которые полностью располагаются на микрофотографии, и прибавляли уменьшенное вдвое число объектов, пересечённых границами изображения.

На препарате подсчитывали количество миосателлитов и количество образующихся «мышечных почек».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в контрольной группе 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 (рис. 1, 2).

В основной группе единичные делящиеся миосателлиты зарегистрированы на 1-е сутки, максимальная интенсивность деления миосателлитов и образования мышечных почек в зоне травмы мышцы отмечена на 7-е сутки, делящиеся миосателлиты зарегистрированы и на 14-е, и на 30-е сутки.

Экспериментальные исследования показали, что при использовании лекарственной пластины, содержащей блокатор JNK SP600125 с медленным высвобождением действующего вещества, количество делящихся миосателлитов и формирующихся мышечных почек в зоне травмы мышцы в основной группе на 7-е, 14-е и 30-е сутки было достоверно выше ($p < 0,05$), чем в контрольной (рис. 1 и 2). Полученные данные свидетельствуют об усилении регенерации мышечной ткани в зоне повреждения.

На рис. 3 показана высокая интенсивность деления миосателлитов и образования мышечных почек в зоне травмы мышцы в основной группе, на рис. 4 – единичные делящиеся миосателлиты и формирующаяся мышечная почка в зоне травмы мышцы в контрольной группе на 7-е сутки после травмы.

Как известно, митогенактивируемые протеинкиназы принимают участие в регуляции деления клеток и апоптоза [6]. В доступной литературе обсуждаются вопросы участия МАРК механизмов в регуляции репарации мышечной ткани. В частности, доказано участие p38 [7, 11] и ERK МАРК в передаче сигналов к дифференцировке [9]. Гораздо меньше внимания уделено JNK каскаду. Нашими предварительными исследованиями установлено, что активная фосфорилированная форма JNK в зоне травматического повреждения мышцы выявляется с 3-х по 9-е сутки после травмы, причём окрашиваются мышечные почки [5].

Результаты настоящего исследования позволяют считать, что локальная блокада JNK МАРК в зоне повреждения мышечной ткани обеспечивает возможность стимуляции репарации повреждённой скелетной мышцы.



Рис. 1. Количество мышечных почек на препарате.
Fig. 1. The amount of muscle buds on the preparation.



Рис. 2. Количество миосателлитов на препарате.
Fig. 2. The amount of myosatellites on the preparation.

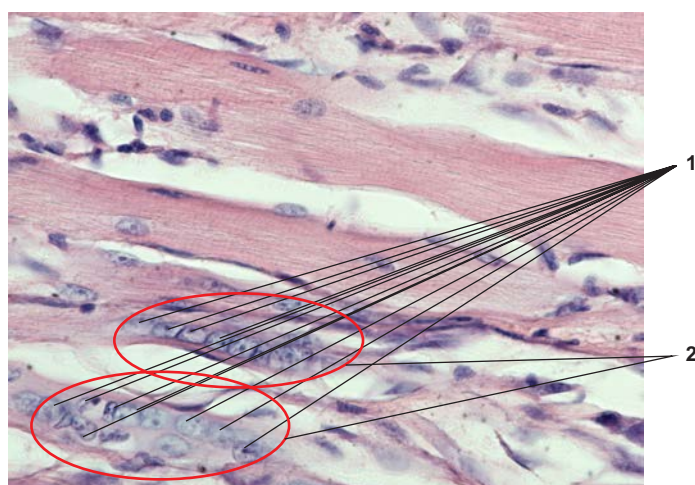


Рис. 3. Мышечные почки и большое количество делящихся миосателлитов на препарате, основная группа, 7-е сутки, окраска гематоксилином и эозином, 400 \times . 1 – ядра миосателлитов; 2 – мышечные почки.
Fig. 3. Muscle buds and large amount of deviding myosatellites on the preparation, the main group, the 7th day, haematoxylin and eosin staining, 400 \times . 1 – nuclei of myosatellites; 2 – muscle buds.

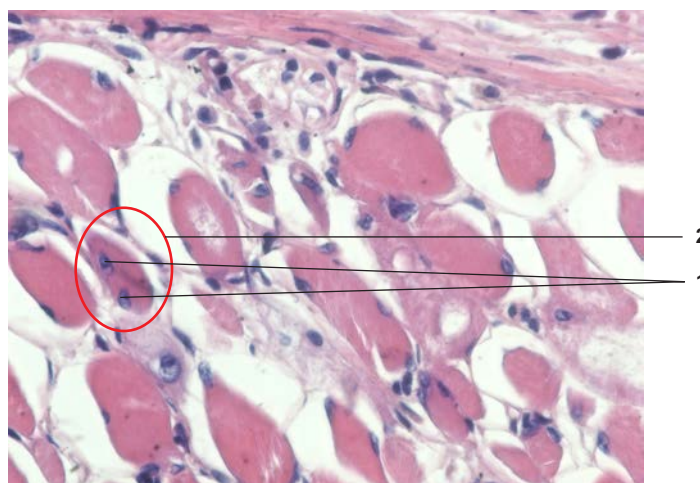


Рис. 4. Мышечная почка и единичные делящиеся миосателлиты на препарате, контрольная группа, 7-е сутки, окраска гематоксилином и эозином, 400 \times . 1 – ядра миосателлитов; 2 – мышечная почка.
Fig. 4. The muscle bud and individual deviding myosatellites on the preparation, the control group, the control group, haematoxylin and eosin staining, 400 \times . 1 – nuclei of myosatellites; 2 – muscle buds.

**ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES**

1. Лекарственная плёнка пролонгированного действия, способ изготовления и способ её приме-

нения: Пат. № 2445074 Рос. Федерация; МПК А61К 9/00 (2006.01), А61К 47/10 (2006.01), А61К 47/38 (2006.01), А61Р 17/02 (2006.01) / М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина; заявитель и патентообладатель Учреждение Россий-

ской академии медицинских наук Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии Сибирского отделения РАМН. – № 2010127029/15, заявл. 01.07.2010; опубл. 20.03.2012. – Бюл. № 8.

Shurygin MG, Shurygina IA. (2012). Drug film of prolonged action, the method of manufacture and the method of its application: Patent 2445074 of the Russian Federation [*Lekarstvennaya plenka prolongirovannogo deystviya, sposob izgotovleniya i sposob ee primeneniya: Pat. № 2445074 Ros. Federatsiya*].

2. Способ восстановления функции поврежденной скелетной мышцы: Пат. № 2302215 Рос. Федерация; МПК А61В 17/56, А61К 35/32 / Мулдашев Э.Р., Нигматуллин Р.Т., Гафаров В.Г., Мухаметов А.Р., Шангина О.Р., Щербakov Д.А., Салихов Э.А.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию». – № 2005126878/14; заявл. 25.08.2005; опубл. 10.07.2007. – Бюл. № 19.

Muldashev ER, Nigmatullin RT, Gafarov VG, Mukhamevov AR, Shangina OR, Sherbakov DA, Salikhov EA. (2007). A method for restoring the function of a damaged skeletal muscle: Patent 2302215 of the Russian Federation [*Sposob vosstanovleniya funktsii povrezhdennoy skeletnoy myshtsy: Pat. № 2302215 Ros. Federatsiya*].

3. Способ приготовления средства, обладающего свойством стимуляции регенерации хрящевой, костной, мышечной тканей и способ стимуляции регенерации хрящевой, костной, мышечной тканей с использованием приготовленного средства: Пат. № 2527701 Рос. Федерация; МПК А61К 38/21, А61К 47/30, А61Р 19/02 / Лебедев В.Ф., Дмитриева Л.А., Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Сумароков А.В., Коршунова Е.Ю.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – № 2013123962/15; заявл. 24.05.2013; опубл. 10.09.2014. – Бюл. № 25.

Lebedev VF, Dmitrieva LA, Shurygina IA, Shurygin MG, Sumarokov AV, Korshunova EY. (2014). A method for preparing an agent having the property of stimulating the regeneration of cartilage, bone and muscle tissues, and a method of stimulating the regeneration of cartilage, bone, and muscle tissues using a prepared preparation: Patent 252770 of the Russian Federation [*Sposob prigotovleniya sredstva, obladayushchego svoystvom stimulyatsii regeneratsii khryashchevoy, kostnoy, myshechnoy tkaney i sposob stimulyatsii regeneratsii khryashchevoy, kostnoy, myshechnoy tkaney s ispol'zovaniem prigotovlennogo sredstva: Pat. № 252770 Ros. Federatsiya*].

4. Шурыгин М.Г., Болбат А.В., Шурыгина И.А. Миосателлиты как источник регенерации мышечной ткани // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 1–8. – С. 1741–1746.

Shurygin MG, Bolbat AV, Shurygina IA. (2015) Myosatellite cells as a source of regeneration of muscle tissue [Miosatellity kak istochnik regeneratsii myshechnoy tkani]. *Fundamental'nye issledovaniya*, (1-8), 1741-1746.

5. 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. – С. 145.

Shurygina IA, Dremina NN, Shaul'skaya ES, Shurygin MG. (2016) Activity of mitogen-activated signal cascades in trauma of muscle [Aktivnost' mitogenaktiviruemykh signal'nykh kaskadov pri travme poperechnopolosatoy myshtsy]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, (5), 145.

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 (Иркутск)*. – 2009. – Т. 89, № 6. – С. 36–40.

Shurygina IA, Shurygin MG, Zelenin NV, Granina GB. (2009) Role of MAP-kinase mechanisms in the regulation of cell growth (review) [Rol' MAP-kinaznykh mekhanizmov v regulyatsii kletochnoy rosta (obzor literatury)]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*, (6), 36-40.

7. De Angelis L. (2005). Regulation of vertebrate myotome development by the p38MAPkinase-MEF2 signaling pathway. *Dev Biol*, 283, 171-179. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.04.009

8. Fukada SI. (2018). The roles of muscle stem cells in muscle injury, atrophy and hypertrophy. *J Biochem*, 163 (5), 353-358. DOI: 10.1093/jb/mvy019

9. Jang YN, Baik EJ. (2013). JAK-STAT pathway and myogenic differentiation. *JAKSTAT*, 2 (2), e23282. DOI: 10.4161/jkst.23282

10. Hwang AB, Brack AS. (2018). Muscle stem cells and aging. *Curr Top Dev Biol*, 126, 299-322. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2017.08.008

11. Ruiz-Bonilla V. (2008). Efficient adult skeletal muscle regeneration in mice deficient in p38beta, p38gamma and p38delta MAP kinases. *Cell Cycle*, 7 (14), 2208-2214.

12. Relaix F, Zammit PS. (2012) Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development*, 139 (16), 2845-2856. DOI: 10.1242/dev.069088

13. Yusuff F, Brand-Saberi B. (2012). Myogenesis and muscle regeneration. *Histochem Cell Biol*, 138 (2), 187-199. DOI: 10.1007/s00418-012-0972-x

Сведения об авторах

Information about the authors

Шурыгина Ирина Александровна – доктор медицинских наук, профессор РАН, заместитель директора по науке, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел. (3952) 29-03-69; e-mail: irinashurygina@gmail.com) © <http://orcid.org/0000-0003-3980-050X>

Shurygina Irina Aleksandrovna – Doctor of Medical Sciences, Professor of RAS, Deputy Director for Science, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology (664003, Irkutsk, ul. Bortsov Revolyutsii, 1; tel. (3952) 29-03-69; e-mail: irinashurygina@gmail.com) © <http://orcid.org/0000-0003-3980-050X>

Шурыгин Михаил Геннадьевич – доктор медицинских наук, заведующий научно-лабораторным отделом, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (e-mail: shurygin@rambler.ru) © <http://orcid.org/0000-0001-5921-0318>

Shurygin Mikhail Gennadyevich – Doctor of Medical Sciences, Head of the Scientific Laboratory Department, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology (e-mail: shurygin@rambler.ru) © <http://orcid.org/0000-0001-5921-0318>