

## АПОПТОЗ В ЗОНЕ ФОРМИРОВАНИЯ СПАЕЧНОГО ПРОЦЕССА В БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ: ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ p38 MAPK КАСКАДА

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

<sup>1</sup>ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск, [iscst@mail.ru](mailto:iscst@mail.ru);

<sup>2</sup>АО «Фармасинтез», Иркутск

---

Апоптоз является одним из важнейших механизмов поддержания гомеостаза как в физиологических, так и в патологических условиях. Цель работы: изучить экспрессию белков семейства Bcl в условиях повреждения брюшины при естественном течении процесса и при блокаде p38 MAPK. В качестве модели спаечного процесса в брюшной полости использовали самцов крыс линии Вистар – контрольную группу (N=40) и группу с введением препарата «Серогард»® (N=40). В сроки от 2 ч до 30 суток иммуногистохимическими методами проведена оценка экспрессии Bcl2 и Bclx в зоне образования спайки. В контрольной группе экспрессия проапоптотических и антиапоптотических белков первые часы течет параллельно. К 12, 24 часам экспрессия Bcl2 интенсивнее, чем Bclx. К 14-м суткам экспрессия Bclx и Bcl2 максимальная, а к 30-м суткам экспрессия Bclx в области формирования спайки высокая и значительно отличается от Bcl2. В основной группе к 6 часам выше экспрессия Bcl2, а к 12, 24 часам, наоборот, экспрессия Bclx значительно выше, чем Bcl2. К 3-м суткам интенсивность окраски на Bclx уменьшается вдвое, но все же выше, чем Bclx. На 14-е сутки окраска на Bcl2 и Bclx минимальная и сохраняется такой до 30 суток. Установлено, что применение Серогарда® при экспериментальном спаечном процессе приводит к активации апоптоза фибробластов в зоне репарации.

Ключевые слова: спаечный процесс, апоптоз, p38 MAPK, Bcl2, Bclx

---

## APOPTOSIS IN THE ADHESION PROCESS IN THE ABDOMINAL CAVITY: THE EFFECT OF BLOCKING P38 MAPK

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

<sup>1</sup>Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, Irkutsk, [iscst@mail.ru](mailto:iscst@mail.ru);

<sup>2</sup>JSC Pharmasyntez, Irkutsk

---

Apoptosis is one of the main mechanisms of haemostasis maintenance both in physiological and in pathological conditions. Aim of the work: to study the expression of Bcl proteins in reparative process on the example of peritoneum at natural history of the process and at the blocking of p38 MAPK. We stimulated the adhesive process in abdominal cavity of male Wistar rats – control group (N = 40) and group with Seroguard® introduction (N = 40). We assessed the expression of Bcl2 and Bclx in the area of adhesion formation at terms from 2 hours to 30 days using immunohistochemical methods. In control group, the expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins is concurrent during the first hours. In 12, 24 hours the expression of Bcl2 becomes more intensive than the expression of Bclx. To the 14<sup>th</sup> day the expression of Bclx and Bcl2 is maximum, and to the 30<sup>th</sup> day the expression Bclx in the area of adhesion formation is high and is significantly different from the expression of Bcl2. In the treatment group, Bcl2 expression is more intensive in 6 hours than Bclx expression, and in 12, 24 hours Bclx expression becomes more intensive. To the 3<sup>rd</sup> day the intensity of staining of Bclx decreases twice but remains higher than the intensity of Bcl2 staining. On the 14<sup>th</sup> day staining of Bcl2 and Bclx is minimal and remains the same up to the 30<sup>th</sup> day. We determine that using Seroguard® in the model of adhesive process causes apoptosis of fibroblast in the reparation area.

Keywords: adhesion, apoptosis, p38 MAPK, Bcl2, Bclx

---

Апоптоз, один из важнейших механизмов поддержания гомеостаза, осуществляется как в физиологических, так и в патологических условиях. В настоящее время проблеме апоптоза и его влиянию на течение и исход различных патологических процессов уделяется много внимания. Апоптоз характеризуется рядом характерных морфологических изменений в структуре клетки, а также рядом ферментзависимых биохимических процессов. В результате происходит элиминация клеток из организма с минимальным повреждением

окружающих тканей. Нарушения в процессе апоптоза могут приводить к накоплению поврежденных клеток. Поэтому понимание путей апоптоза важно для разработки эффективной терапии при многих заболеваниях [1].

Семейство белков Bcl играет важную роль в регуляции апоптоза, и среди них есть как про-, так и антиапоптотические типы [2].

Белки семейства Bcl-2 признаны основными регуляторами митохондриального пути апоптоза. Они контролируют проницаемость наружной мембраны митохондрий. Кроме того, Bcl-2 белки также обнаружены в других внутриклеточных компартментах, таких как эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи, ядро, пероксисомы. На уровне этих органелл белки семейства Bcl-2 не только регулируют проницаемость наружной мембраны митохондрий удаленно, но также участвуют в основных клеточных процессах, включая гомеостаз кальция, контроль клеточного цикла и миграцию клеток. С развитием методов визуализации живых клеток и созданием флуоресцентных рекомбинантных белков стало ясно, что распределение белков Bcl-2 внутри клетки является динамическим процессом, на который глубоко влияют изменения в клеточном микроокружении. Высокодинамичный процесс внутриклеточного распределения белков семейства Bcl-2 является критическим для определения судьбы клетки [3, 4, 5]. Белки Bcl-2 функционируют посредством межбелковых взаимодействий. Воздействие на белки семейства Bcl-2 открывает новые возможности воздействия на патологические процессы [6].

Поскольку семейство белков Bcl2 является ключевым регулятором апоптоза, нарушения его функций способствуют развитию многих заболеваний, включая рак, нейродегенеративные расстройства и аутоиммунные заболевания [7].

Апоптоз также играет решающую роль в репаративных процессах регенерации. В частности, контроль над плотностью клеток в ткани, образующейся в месте заживления раны, опосредуется апоптозом [8-10].

Цель работы: изучить экспрессию белков семейства Bcl в условиях повреждения брюшины при естественном течении процесса и при блокаде p38 MAPK.

### **Материал и методы исследования**

В качестве модели спаечного процесса в брюшной полости использовали самцов крыс линии Вистар [11, 12]. Представителям контрольной группы (N=40) был введен в брюшную полость физиологический раствор (3 мл), представителям опытной группы (N=40) – препарат «Серогард»® того же объема (АО «Фармасинтез», Россия, товарный знак (знак обслуживания) № 529254 «СЕРОГАРД»). Фармакодинамическим эффектом препарата «Серогард»® является пролонгированная блокада активности p38 MAPK (митогенактивируемой протеинкиназы) [13].

Все исследования проведены с соблюдением этических норм. Исследование одобрено комитетом по этике Иркутского научного центра хирургии и травматологии.

Исследования проводили на 8 временных точках в сроки от 2 часов до 30 суток. Проводили иммуногистохимическое окрашивание образцов. В ходе исследования применяли:

- антитела к Bcl2 rabbit polyclonal (Abbiotec Cat. № 250555, Lot 09110202) в рабочем разведении 1:300 (исследование антиапоптоза);
- Bclx rabbit monoclonal (Epitomics, Cat. № 1018-3, Lot E-07-12-01) в рабочем разведении 1:100 (исследование проапоптоза).

Для математической оценки интенсивности апоптоза и антиапоптоза производили подсчет количества окрашенных Bclx и Bcl2 клеток по отношению к неокрашенным. Определяли медиану, 25%-ный и 75%-ный квартили.

### Результаты исследования и их обсуждение

Нами произведены подсчет процента окрашенных на Bclx и Bcl2 клеток и сравнение интенсивности окрашивания внутри основной и контрольной групп, а также между ними.

Таблица 1

Окраска на Bcl2 и Bclx клеток внутри основной и контрольной группы

Срок	Основная		P <sub>u</sub>	Контроль		P <sub>u</sub>
	Bcl2, %	Bclx, %		Bcl2, %	Bclx, %	
2 часа	1,5 (1–3)	1,5 (0–2)	1,0	10,5 (10–12)	6,0 (5–7)	<b>0,0277</b>
6 часов	15 (10–17)	5 (2–8)	<b>0,0431</b>	3,5 (1–5)	5,0 (2–15)	0,1775
12 часов	3 (3–3)	17,5 (13–21)	<b>0,0277</b>	35 (17–50)	12,5 (10–20)	<b>0,0116</b>
24 часов	26 (22–30)	40 (38–40)	<b>0,0277</b>	46,5 (37–52)	32 (30–38)	<b>0,0464</b>
3 суток	7,5 (3–10)	20 (15–20)	<b>0,0277</b>	47 (40–50)	41 (35–50)	0,2339
7 суток	3,5 (3–5)	2,5 (2–5)	0,8339	2,5 (2–5)	2,5 (2–3)	0,8339
14 суток	2,5 (2–5)	5,5 (5–7)	<b>0,0277</b>	89,5 (87–95)	91 (85–93)	0,8339
30 суток	9 (7–30)	23,5 (21–25)	0,1158	14 (12–15)	56 (42–65)	<b>0,0277</b>

Как следует из таблицы 1, в контрольной группе экспрессия проапоптозных и антиапоптозных белков первые часы течет параллельно. К 12, 24 часам экспрессия Bcl2 интенсивнее, чем Bclx. К 14-м суткам экспрессия Bclx и Bcl2 максимальная, а к 30-м суткам

экспрессия *Vclx* в области формирования спайки высокая и значительно отличается от *Vcl2* (рис. 1).

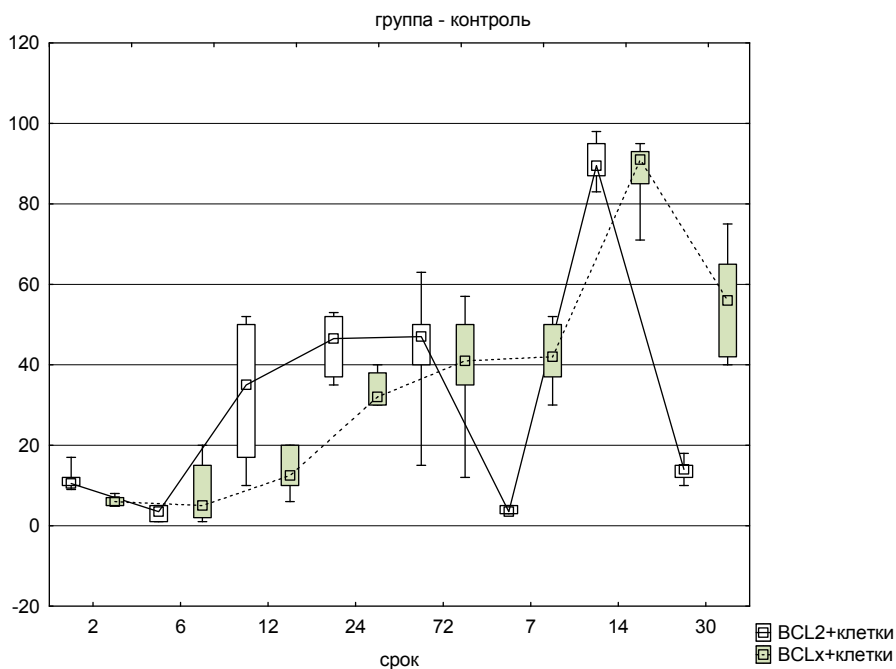


Рис. 1. Интенсивность окраски *Bclx* и *Bcl2* клеток контрольной группы

В контрольной группе к 6 часам экспрессия *Bcl2* выше, а к 12, 24 часам, наоборот, экспрессия *Bclx* значительнее, чем *Bcl2*. К 3-м суткам интенсивность окраски на *Bclx* уменьшается вдвое, но все же выше, чем *Bcl2*. На 14-е сутки окраска на *Bcl2* и *Bclx* минимальная и сохраняется такой до 30 суток (рис. 2).

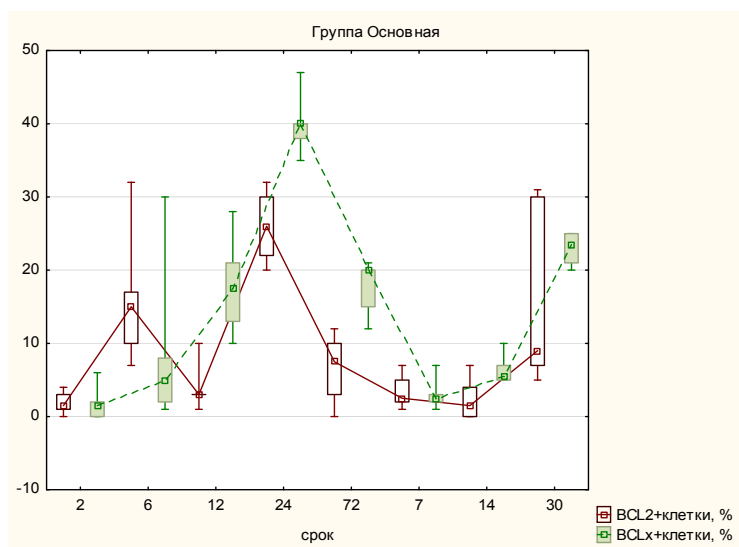


Рис. 2. Интенсивность окраски *Bclx* и *Bcl2* клеток в основной группе

Закономерности экспрессии Vcl2 и Vclx1 клеток при сравнении между основной и контрольной группами представлены в таблице 2.

Таблица 2

Сравнение интенсивности окраски Vclx и Vcl2 клеток между группами

Срок	Vcl2, %		P <sub>u</sub>	Vclx, %		P <sub>u</sub>
	Основная	Контроль		Основная	Контроль	
2 часа	1,5 (1–3)	10,5 (10–12)	<b>0,0049</b>	1,5 (0–2)	6,0 (5–7)	<b>0,0187</b>
6 часов	15 (10–17)	3,5 (1–5)	<b>0,0078</b>	5 (2–8)	5,0 (2–15)	0,9262
12 часов	3 (3–3)	35 (17–50)	<b>0,0054</b>	17,5 (13–21)	12,5 (10–20)	0,2547
24 часа	26 (22–30)	46,5 (37–52)	<b>0,0050</b>	40 (38–40)	32 (30–38)	<b>0,0290</b>
3 суток	7,5 (3–10)	47 (40–50)	<b>0,0017</b>	20 (15–20)	41 (35–50)	<b>0,0088</b>
7 суток	2,5 (3–5)	2,5 (2–5)	0,4107	2,5 (2–5)	2,5 (2–3)	0,4901
14 суток	1,5 (0–4)	89,5 (87–95)	<b>0,0049</b>	5,5 (5–7)	91 (85–93)	<b>0,0047</b>
30 суток	9 (7–30)	14 (12–15)	0,4217	23,5 (21–25)	56 (42–65)	<b>0,00173</b>

Как следует из таблицы 2, экспрессия Vcl2 увеличивается первые 6 часов в основной группе, в 12–24 часа значимо ниже, чем в контрольной группе, а в 3-и и 14-е сутки значительно ниже, чем в контрольной группе (рис. 3).

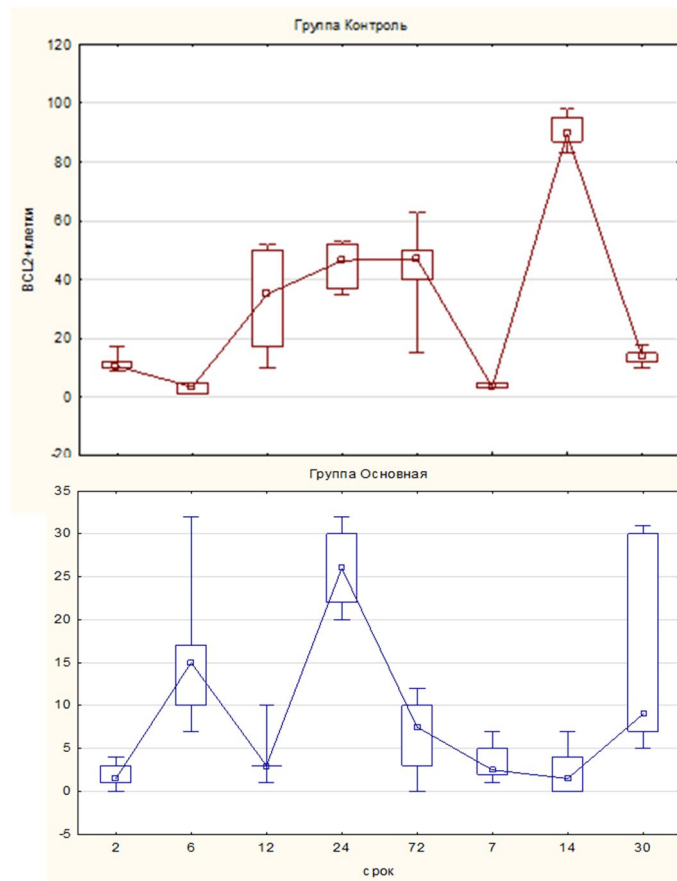


Рис. 3. Окраска на Vcl2 в основной и контрольной группах

Экспрессия Vclx значительно увеличивается к 3-м суткам в контрольной группе с максимумом интенсивности к 14-м и 30-м суткам по сравнению с основной группой (рис. 4).

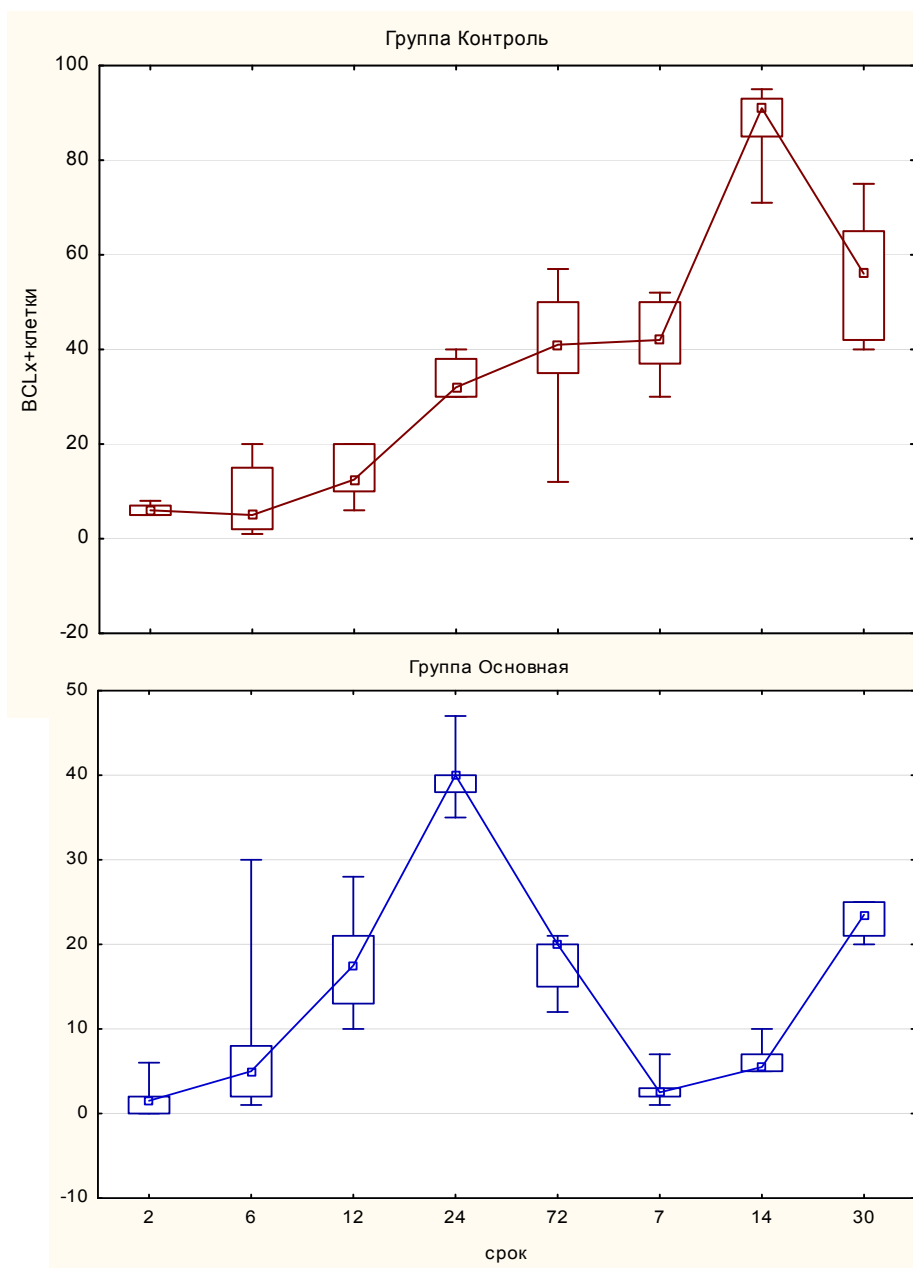


Рис. 4. Окраска на Vclx в основной и контрольной группах

Таким образом, в ходе исследования показано, что при экспериментальном повреждении брюшины запускаются как апоптоз, и антиапоптоз. В ранние сроки после повреждения брюшины превалирует окраска на маркеры антиапоптоза – до 3 суток, позднее на первый план выходят процессы апоптоза. Наиболее явно различия определяются к концу наблюдения – на 30-е сутки. За счет механизмов запуска апоптоза элиминируется большая популяция клеток фибробластического ряда из зоны повреждения брюшины [14, 15]. При этом окраска на выявление маркеров антиапоптоза в ткани имеет двухволновый характер с максимальной выраженностью на 1–3-и сутки и 14-е сутки процесса. Данные сроки совпадают с периодом роста грануляционной ткани (3-е сутки) и процессом ее созревания

(14-е сутки). На финальной точке наблюдения (30-е сутки) количество клеток, демонстрирующих экспрессию антиапоптозных белков, резко снижается (рис. 5).

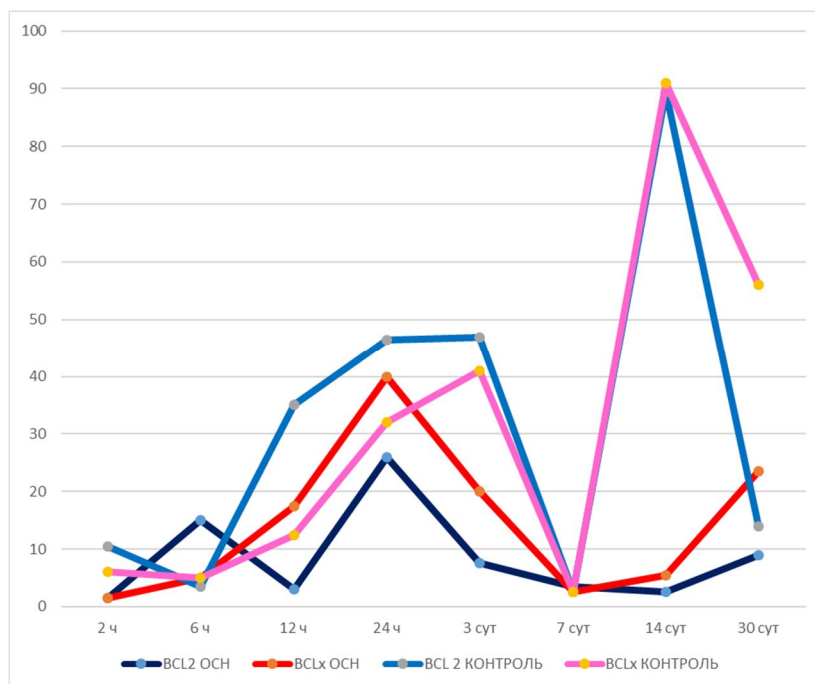


Рис. 5. Процессы апоптоза и антиапоптоза после травматического повреждения брюшины

### Выводы

Нами установлено, что применение Серогарда® при экспериментальном спаечном процессе приводит к активации апоптоза фибробластов в зоне репарации. Указанный механизм действия может предопределить снижение спайкообразования в зоне травмы брюшины.

### Список литературы

1. D'Arcy M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell. Biol. Int. 2019. vol. 43, no. 6. P. 582-592. DOI: 10.1002/cbin.11137.
2. Gordeeva A.V., Labas Y.A., Zvyagilskaya R.A. Apoptosis in unicellular organisms: mechanisms and evolution. Biochemistry (Mosc). 2004. vol. 69, no. 10. 1055-1066.
3. Popgeorgiev N., Jabbour L., Gillet G. Subcellular localization and dynamics of the Bcl-2 family of proteins. Front Cell. Dev. Biol. 2018. vol. 6. no. 13. DOI: 10.3389/fcell.2018.00013.
4. Kale J., Osterlund K., Andrews D.W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. Cell Death Differ. 2018. vol. 25, no 1. P. 65-80. DOI: 10.1038/cdd.2017.186.
5. Birkinshaw R.W., Czabotar P.E. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. Semin Cell. Dev. Biol. 2017. vol. 72. P. 152-162. DOI:



10.1016/j.semcdb.2017.04.001.

6. Moldoveanu T., Follis A.V., Kriwacki R.W., Green D.R. Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem Sci.* 2014. vol. 39, no. 3. P. 101-111. DOI: 10.1016/j.tibs.2013.12.006.
7. Siddiqui W.A., Ahad A., Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch. Toxicol.* 2015. vol. 89, no. 3. P. 289-317. DOI: 10.1007/s00204-014-1448-7.
8. Bhan S., Mitra R., Arya A.K., Pandey H.P., Tripathi K. A study on evaluation of apoptosis and expression of bcl-2-related marker in wound healing of streptozotocin-induced diabetic rats. *ISRN Dermatol.* 2013. vol. 2013:739054. DOI: 10.1155/2013/739054.
9. Wu Y.S., Chen S.N. Apoptotic cell: linkage of inflammation and wound healing. *Front Pharmacol.* 2014. vol. 5. DOI: 10.3389/fphar.2014.00001.
10. Darby I.A., Laverdet B., Bonté F., Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet Investig Dermatol.* 2014. vol. 7. P. 301-311. DOI: 10.2147/CCID.S50046.
11. Аюшинова Н.И., Лепехова С.А., Шурыгина И.А., Рой Т.А., Шурыгин М.Г., Зарицкая Л.В., Гольдберг О.А. Способ моделирования спаечного процесса в брюшной полости // Патент РФ № 2467401. Патентообладатель ФГБНУ ИНЦХТ. 2012. Бюл. № 32.
12. Аюшинова Н.И., Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Лепехова С.А., Балыкина А.В., Малгатаева Е.Р., Попова А.Д., Янкелевич С.А. Экспериментальная модель для разработки способов профилактики спаечного процесса в брюшной полости // Сибирский медицинский журнал. 2012. Т. 109, № 2. С. 51-53.
13. Shurygin M.G., Shurygina I.A. Compounds, pharmaceutical compositions and a method for the prophylaxis and treatment of the adhesion process. Patent WO2012156938. Applicants JSC "Pharmasyntez". 2014.
14. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Аюшинова Н.И. Экспрессия маркеров апоптоза при развитии спаечного процесса в брюшной полости в эксперименте // Вестник Российской академии медицинских наук. 2014. Т. 69, № 5-6. С. 29-33. DOI: 10.15690/vramn.v69i5-6.1040.
15. Shurygina I.A., Aushinova N.I., Shurygin M.G. Effect of p38 MAPK inhibition on apoptosis marker expression in the process of peritoneal adhesion formation. *International Journal of Biomedicine.* 2018. vol. 8, no. 4. P. 342-346.