

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КАК ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ НЕДИГИДРОПИРИДИНОВЫХ БЛОКАТОРОВ МЕДЛЕННЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ

С. В. Скальский¹, Т. Ф. Соколова¹, Д. А. Сычев²

Исследовали влияние блокаторов медленных кальциевых каналов на культуру клеток, содержащих перитонеальные фибробласты крыс с и без гемоперитонеума. Установлено, что верапамил (0,1 мг/мл) оказывает выраженный эффект в отношении избыточной активности перитонеальных фибробластов, снижая уровень пролиферации клеток, нормализуя их коллагенсинтетическую функцию, уменьшая избыточную продукцию гиалуроновой кислоты. Дилтиазем (0,1 мг/мл) оказывает менее значимое, чем верапамил (в среднем на 35,6 % $p < 0,05$), нормализующее влияние на функциональную активность перитонеальных фибробластов и избыточную продукцию компонентов межклеточного матрикса. У нифедипина (0,1 мг/мл) данный эффект отсутствует. Таким образом, функциональная активность перитонеальных фибробластов может служить тест-системой для изучения фармакодинамики недигидропиридиновых блокаторов медленных кальциевых каналов.

Ключевые слова: блокаторы медленных кальциевых каналов; фибробласты; оксипролин; гиалуроновая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на разнообразие способов профилактики и лечения спаечного процесса, результаты их применения в клинической практике нельзя признать удовлетворительными [1 – 4, 12]. Большинство из используемых способов (хирургические, связанные с иссечением; физиотерапевтические методы электро-, свето-, звукотерапии; медикаментозные с использованием глюкокортикоидов, средств с коллагеназной активностью и др.) воздействуют на заключительные этапы спайкообразования, тогда как иницирующие механизмы (клеточные и гуморальные факторы неспецифической резистентности к действию патогенных факторов, активация которых и является, по сути, сигналом к образованию спаек) в качестве объектов регуляции не рассматриваются. Одним из перспективных направлений решения этой проблемы является использование фармакологических веществ, обладающих действием на ключевые патогенетические звенья спаечного процесса и прежде всего на фибробласты, являющиеся клетками-эффекторами спаек. Возможным инструментом фармакологического действия на функцию фибробластов могут быть антагонисты кальция (блокаторы медленных кальциевых каналов — БМКК), которые тормозят или полностью блокируют вход ионов кальция внутрь клеток по потенциал-зависимым кальциевым каналам. В литературе имеются

немногочисленные данные, прямо или косвенно свидетельствующие о наличии у БМКК эффектов, реализуемых модификацией формирования соединительной ткани и функциональной активности фибробластов [8, 10, 11]. Однако БМКК — это большая и достаточно неоднородная по химической структуре группа лекарственных средств, которая представлена высокоспецифичными в отношении медленных кальциевых каналов (производными фенилалкиламина, бензотиазепина, дигидропиридина) и неспецифичными препаратами (дифенилпиперазинами, производными прениламина и другими). Вероятно, препараты разных групп БМКК обладают разной активностью в отношении формирования соединительной ткани. Выявление препаратов, обладающих наиболее выраженным влиянием на нормализацию функции фибробластов, предотвращающим избыточный рост соединительной ткани и образование послеоперационных спаек, имеет большое значение для описания новых свойств у известных, зарекомендовавших себя в медицинской практике, лекарственных средств, для расширения показаний к их применению.

Целью настоящего исследования явилось изучение эффекта препаратов разных групп БМКК: производных фенилалкиламина (верапамил), бензотиазепина (дилтиазем), дигидропиридина (нифедипин) в отношении коллагенсинтетической и пролиферативной функций перитонеальных фибробластов в сравнении со степенью влияния на образование спаек в брюшной полости у крыс на модели гемоперитонеума.

¹ ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Россия, 644099, Омск, ул. Ленина, 12.

² ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» МЗ РФ, Россия, 125993, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 53 беспородных белых крысах массой 220–230 г из питомника Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Эксперименты проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (Страсбург, Франция, 1986) и согласно правилам лабораторной практики РФ (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.). Животных содержали в одинаковых условиях на стандартном пищевом и питьевом режиме. В качестве экспериментальной модели спаечного процесса было выбрано введение в брюшную полость аутокрови [5]. На 10 сут после моделирования гемоперитонеума сразу после эвтаназии декапитацией крыс под эфирным наркозом выделяли перитонеальные монукулеары для формирования первичной культуры клеток. Оценку фармакологических свойств препаратов из различных групп высокоспецифичных БМКК – верапамила, дилтиазема и нифедипина – в качестве регуляторов функции фибробластов при индукции спаечных процессов проводили в первичной культуре перитонеальных клеток. Первичной культуре мы отдали предпочтение потому, что такие культуры наиболее чувствительны ко всем внешним факторам, а клетки таких культур по своим фенотипическим и генотипическим характеристикам наиболее близки к соответствующим клеткам здорового организма. Объектом исследования являлись активированные перитонеальные фибробласты, которые получали путем промывания брюшной полости 10 мл среды RPMI-1640 (“Sigma”) с антибиотиками (100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина) и 10 % раствором гепарина через прокол в каудальной трети белой линии живота. Образцы перитонеальных смывов центрифугировали при 800–1000 об/мин в течение 10 мин для осаждения клеточных элементов, которые затем трижды отмывали средой RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 % глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина. Выделение клеток проводили при 4 °С. Количество клеток в среде определяли методом подсчета в камере Горяева и разведением в среде доводили концентрацию клеток до $2 \cdot 10^6$ /мл. Также подсчитывали число жизнеспособных клеток при окраске трипановым синим. Полученные суспензии содержали 89–95 % живых клеток. Затем суспензию перитонеальных клеток, содержащую активированные фибробласты и клетки микроокружения, в том числе и активированные макрофаги, делили на 4 одинаковых пула, составляющих исследовательские группы, и помещали в чашки Петри диаметром 40 мм с покровными стеклами, покрытыми синтетическим аналогом внеклеточного матрикса поли-D-лизином (НПП “ПанЭко”, Россия, производство — США). Клетки культивировали в 3 мл среды RPMI-1640 с добавлением эмбриональной

телячьей сыворотки, глутамина, пенициллина и стрептомицина. Первую (1) группу клеток культивировали в среде RPMI-1640 без добавления БМКК. В суспензии клеток 2-й — 4-й экспериментальных групп добавляли раствор верапамила (2-я группа), дилтиазема (3-я группа) и нифедипина (4-я группа) до конечной концентрации 0,1 мг/мл. В эксперименте использовали раствор верапамила 0,25 % концентрации в ампулах по 2 мл (ОАО “Биосинтез”, Пенза, Россия); раствор дилтиазема (Diltiazem Hydrochloride Injection, Hospira) во флаконах по 10 мл в концентрации 5 мг/мл; раствор нифедипина (Адалат, Bayer, Германия), во флаконах по 50 мл в концентрации 100 мкг/мл. Контролем служили клеточные культуры неактивированных фибробластов (5-я группа), полученные от 15 интактных крыс. Клетки инкубировали 24 ч при 37 °С и в атмосфере 5 % CO₂. По окончании культивирования среду сливали, центрифугировали (1500 об/мин, 10 мин), супернатант разливали по порциям и хранили при –20 °С до момента использования в течение 3–5 дней. Покровные стекла промывали в растворе Хенкса, фиксировали, окрашивали по Романовскому — Гимза, подвергали цитологическому анализу. Пролиферативную активность фибробластов оценивали по количеству клеток с морфологическими признаками митозов. Оценку митотической активности фибробластов проводили путем определения митотического индекса по формуле: $n/N \cdot 100$ %, где n — число клеток, вступивших в митоз, N — общее количество клеток. Микроскопию мазков проводили с помощью бинокулярного светового микроскопа “Carl Zeiss” (Германия) при иммерсионном увеличении $\times 1000$ (окуляр $\times 10$; объектив $\times 100$). В супернатантах клеточных культур определяли содержание оксипролина и гиалуроновой кислоты. Содержание оксипролина определяли по методике [6]. Содержание свободного и суммарного оксипролина рассчитывали по калибровочной кривой и выражали в микромолях на 1 л. По разности содержания свободного и суммарного оксипролина находили количество белковосвязанного оксипролина. Степень стимуляции коллагеногенеза фибробластами в культуре клеток оценивали по количеству белковосвязанного оксипролина. О синтезе гликозаминогликанов фибробластами судили по концентрации гиалуроновой кислоты в культуральной жидкости. Количество гиалуроновой кислоты определяли по карбазольной реакции Дише в модификации [7].

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с использованием пакетов “Statistica 6.0 for Windows”, биостатистика (StatSoft, Inc. США) и MS Excel в среде Windows XP. Анализ характера распределения полученных данных осуществляли построением гистограмм с последующей проверкой на нормальность по критерию Шапиро – Уилка. Средние выборочные значения количественных признаков приведены в тексте в виде $M \pm SE$, где M – среднее выборочное, SE – стандартная ошибка среднего.

Для сравнения 2 групп данных использовался *t*-тест (Стьюдента). Для оценки достоверности различий между процентными долями 2 выборок использовали критерий Фишера. Корреляционный анализ проводили с применением рангового коэффициента корреляции Спирмена. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости *p* принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования с использованием культур клеток показали, что через 24 ч экспозиции в питательной среде с верапамилом (2-я группа), дилтиаземом (3-я группа), нифедипином (4-я группа) и без добавления лекарственных средств (1-я группа) при морфологической оценке клеточных культур во всех исследуемых группах монослой клеток был целостным и равномерным. Фибробласты в культуре образовали систему из параллельно расположенных клеток веретенообразной формы. Преобладали активированные фибробласты, имеющие большую величину и отростки, неактивные фибробласты меньших размеров встречались реже. Макрофаги выглядели как распластанные удлиненные клетки с большим количеством отростков, моноциты сохраняли обычную форму и размеры. Пролиферативная активность неактивированных *in vivo* перитонеальных фибробластов (контроль) и активированных клеток (1-я группа) без добавления БМКК в культуральную среду, а также при добавлении в культуры клеток раствора верапамила (2-я группа), дилтиазема (3-я группа) и нифедипина (4-я группа) была различной. Пролиферативная активность фибробластов 1-й группы, активированных *in vivo*, через 1 сут культивирования была высокой, митотический индекс превышал аналогичные показатели в группе контроля в 5,3 раза, *p* < 0,05 (таблица). Выявлено наличие тесной и положительной связи с коэффициентом корреляции 0,91 (*p* < 0,05) между митотическим индексом (показателем пролиферации фибробластов) и числом соединительнотканых спаек в брюшной полости крыс на 10 сут после моделирования аутогемоперитонеума. Верапамил при введении в

культуру клеток (группа 2) предотвращал чрезмерную активацию фибробластов: митотическая активность клеток снизилась на 58,5 %, составляя 41,5 % от уровня в клетках интактных культур *p* < 0,05 (таблица). Добавление дилтиазема (группа 3) в культуру клеток вызывало менее значимое, в сравнении с верапамилом, уменьшение пролиферативного ответа активированных фибробластов. Митотический индекс в 3-й группе был ниже значений 1-й группы на 23,6 %, составляя 76,4 % от уровня интактных культур *p* < 0,05. Сравнительный анализ пролиферативной активности фибробластов во 2-й (41,5 %) и 3-й группах (76,4 %) выявил достоверное различие показателей (*p* < 0,05, таблица). Нормализующий эффект дилтиазема был менее выражен, соответствие митотического индекса фибробластов уровню контроля (интактные, неактивированные фибробласты) при действии дилтиазема почти в 2 раза ниже, чем при действии верапамила *p* < 0,05. Нифедипин не оказывал влияния на чрезмерную активацию фибробластов, митотическая активность клеток в 1-й и 4-й группах статистически достоверных различий не выявлено.

Оценка коллагенсинтетической функции фибробластов, заключающаяся в определении в культуральной среде белково-связанного оксипролина – маркера синтеза коллагена, показала, что при моделировании гемоперитонеума, сопровождающегося повышенным спайкообразованием в брюшной полости крыс в культуре активированных *in vivo* фибробластов наблюдали заметное стимулирование образования белково-связанного оксипролина, который является характерным компонентом фиброзной соединительной ткани. Установлено повышение коллагенсинтетической функции активированных фибробластов 1-й группы в 4,1 раза по сравнению с контролем *p* < 0,05 (таблица). Отмечена прямая корреляционная связь между количеством белково-связанного оксипролина и числом спаек в брюшной полости крыс с аутогемоперитонеумом (*r* = 0,78, *p* < 0,05). Инкубация клеток в среде с исследованными препаратами вызывала снижение (верапамил, дилтиазем) концентрации белково-связанного оксипролина в инкубационной среде, нифедипин не вли-

Морфофункциональные показатели перитонеальных фибробластов крыс (*M* ± *SE*)

| Группа | Митотический индекс | Оксипролин, мкмоль/л | Гиалурионовая кислота, ммоль/л |
|---|--|---|--|
| Контроль (интактные, неактивированные ФБ) | 2,3 ± 0,2 | 6,5 ± 0,4 | 0,5 ± 0,03 |
| 1 (Интактные, активированные ФБ) | 12,3 ± 0,4* | 26,7 ± 1,7* | 1,6 ± 0,12* |
| 2 (ФБ + верапамил) | 5,1 ± 0,1** (41,5 %) | 8,9 ± 0,2** (33,3 %) | 0,98 ± 0,05** (61,3 %) |
| 3 (ФБ + дилтиазем) | 9,4 ± 0,3**° (76,4 %) [#] [45,7 %] [°] | 14,3 ± 1,1**° (53,6 %) [#] [37,7 %] [°] | 1,28 ± 0,06**° (80,0 %) [#] [23,4 %] [°] |
| 4 (ФБ + нифедипин) | 11,5 ± 0,3 | 23,1 ± 0,5 | 1,48 ± 0,08 |

Примечание: ФБ – фибробласты, () – % от уровня показателей 1 группы, [] – снижение эффекта дилтиазема в сравнении с верапамилом на ... %, * достоверность различий показателей группы 1 и контроля, ** группы 1 и групп 2, 3, 4, [#] группы 1 и групп 2 и 3, [°] группы 2 и группы 3, *p* < 0,05.

ял на данный показатель. Наибольшим эффектом обладал верапамил, уменьшение количества белково-связанного оксипролина в культуральной среде перитонеальных фибробластов составляло 66,7 % (33,3 % от уровня в культуральной жидкости интактных фибробластов $p < 0,05$, таблица). Нормализующее действие коллагенсинтетической функции фибробластов дилтиаземом было менее выражено. Соответствующие показатели в 3-й группе были снижены на 46,4 % по сравнению с 1-й группой (53,6 % от уровня в культуральной жидкости интактных фибробластов, $p < 0,05$, таблица). Добавление нифедипина не влияло на количество оксипролина в культуральной жидкости, показатели в 1-й и 4-й группах практически не различались (таблица).

Сравнительный анализ секретируемой фибробластами гиалуроновой кислоты, являющейся, наряду с коллагеном, одним из основных компонентов межклеточного матрикса соединительной ткани, выявил статистически значимое увеличение ее содержания в культуральных средах активированных клеток (1-я группа) по сравнению с контролем. Сопоставление уровней гиалуроновой кислоты в супернатантах культур фибробластов в 1-й и контрольной группах продемонстрировало 3-кратное увеличение синтеза гиалуроновой кислоты активированными *in vivo*, в результате моделирования у крыс гемоперитонеума, перитонеальными фибробластами $p < 0,05$ (таблица). Верапамил (2-я группа) в концентрации 0,1 мг/мл (24 ч инкубации) снижал индуцированную активацию синтеза гиалуроновой кислоты на 38,7 % $p < 0,05$ (1-я группа, таблица). Инкубация клеток с дилтиаземом (3-я группа) сопровождалась менее значимым, чем во 2-й группе, снижением количества гиалуроновой кислоты в культуральной жидкости, которое составило 80,0 % от уровня показателей 1-й группы $p < 0,05$ (таблица). Нифедипин не оказывал существенного действия на гиперпродукцию гиалуроновой кислоты фибробластами. Данные различия эффектов разных БМКК могут быть объяснены разной фармакологической активностью препаратов производных фенилалкиламина, бензотиазепина, дигидропиридина в отношении пролиферативной и белоксинтезирующей функций фибробластов. Например, проникающие внутрь клетки-эффектора верапамил и дилтиазем, в отличие от нифедипина, имеют дополнительные рецепторы в мембране митохондрий [9].

Таким образом, исследования по поиску ранее неизвестных свойств у уже применяемых препаратов различных групп БМКК (предотвращение избыточного роста соединительной ткани и образования послеоперационных спаек путем воздействия на функции фибробластов) выявили, что верапамил и дилтиазем оказывали фармакологический эффект на все исследуемые показатели, а у нифедипина данный эффект не выявлен. Максимальной эффективностью по нормализации избыточной функциональной активности пери-

тонеальных фибробластов при моделировании гемоперитонеума у крыс обладал препарат из группы производных фенилалкиламина – верапамил. Верапамил оказывал выраженный ингибирующий эффект на пролиферативную активность фибробластов, их коллагенсинтезирующую функцию, продукцию гиалуроновой кислоты, что внесло свой вклад в предотвращение избыточного образования соединительной ткани. Производное бензотиазепина дилтиазем также влиял на морфофункциональные показатели фибробластов, но нормализующее действие препарата было ниже, чем у верапамила в среднем на 35,6 % ($p < 0,05$). Производное дигидропиридина нифедипин подобными свойствами не обладал. Результаты проведенных экспериментальных исследований новых фармакологических эффектов БМКК по регуляции образования заместительной соединительной ткани с использованием культур клеток подтверждают наличие выраженной активности у производного фенилалкиламина, являются основой дальнейших испытаний новых свойств препаратов на живых системах (*in vivo*) и указывают на перспективность проведения исследований по разработке препарата на основе верапамила для профилактики и лечения спайкообразования в клинике.

ВЫВОДЫ

1. Верапамил (0,1 мг/мл, 24 ч) тормозит, индуцированную *in vivo* (модель гемоперитонеума) активность перитонеальных фибробластов, снижая избыточную продукцию ими компонентов межклеточного матрикса (оксипролина на 66,7 %, $p < 0,05$, гиалуроновой кислоты на 38,7 %, $p < 0,05$). Дилтиазем (0,1 мг/мл, 24 ч) оказывает нормализующий эффект в среднем на 35,6 %, $p < 0,05$ менее выраженный, чем верапамил. Нифедипин (0,1 мг/мл) данным эффектом не обладает.
2. Верапамил (0,1 мг/мл) проявляет антипролиферативный эффект в отношении перитонеальных фибробластов крыс (снижает митотическую активность на 58,5 %, $p < 0,05$).
3. Способность верапамила снижать процесс спайкообразования может служить экспериментальной базой для разработки нового метода профилактики данного осложнения в клинике.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. С. Аникин, И. В. Лившиц, А. Н. Рыбалка, *Крымский ж. эксперим. и клин. мед.*, **2** (3 – 4), 4 – 9 (2012).
2. В. В. Бойко, И. А. Тарабан, Д. О. Евтушенко и др., *Харьківська хірургічна школа*, **64**(1), 87 – 90 (2014).
3. В. А. Бурлев, Е. Д. Дубинская, Н. А. Ильясова и др., *Проблемы репродукции*, № 4, 10 – 18 (2011).
4. А. И. Дронов, К. О. Задорожная, В. Л. Дронова и др., *Хирургия. Восточная Европа*, **14**(2), 124 – 129 (2015).
5. С. В. Скальский, Г. А., Шамрай, Т. И. Долгих и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **144**(10), 19 – 20 (2007).
6. П. Н. Шараев, *Лаб. дело*, № 5, 283 – 285 (1990).
7. П. Н. Шараев, Н. С. Стрелков, В. В. Гунчев, *Клин. лаб. диагностика*, № 3, 21 – 22 (1996).

8. P. Avci, A. Gupta, M. Sadasivam, et al., *Semin Cutan Med Surg.*, **32**(1), 41 – 52 (2013).
9. R. F. Boggio, V. M. Freitas, F. M. Cassiola, *Burns*, **37**(4), 616 – 625 (2011).
10. Q. Chen, F. Guo, S. Liu, et al., *Cardiovasc. Res.*, **96**(3), 484 – 493 (2012).
11. R. Ferland, P. K. Campbell, *Surg Technol Int.*, **18**, 137 – 143 (2009).
12. D. Robertson, G. Lefebvre, *JOGC*, **32**(6), 598 – 602 (2010).

Поступила 26.01.17

FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERITONEAL FIBROBLASTS AS A MARKER FOR STUDYING PHARMACODYNAMICS OF NON-DIHYDROPYRIDINE CALCIUM CHANNEL BLOCKERS

S. V. Skal'skii¹, T. F. Sokolova¹, and D. A. Sychev²

¹ Omsk State Medical University, ul. Lenina 12, Omsk, 644099 Russia

² Russian Medical Academy of Postgraduate Education, ul. Barrikadnaya 2/1, Moscow, 125993 Russia

We have studied the impact of non-dihydropyridine calcium channel blockers (CCBs) on the cell culture containing peritoneal fibroblasts in rats with and without hemoperitoneum. It is established that verapamil (0.1 mg/mL) produces clear effect to prevent the excessive formation of post-surgical adhesions by regulatory impact on the extreme activity of peritoneal fibroblasts, reducing the level of cell proliferation, normalizing their collagen-synthetic ability, and reducing the extra production of hyaluronic acid. Diltiazem (0.1 mg/mL) produces a less significant normalizing action than verapamil (by 35.6%, $p < 0.05$) on the functional activity of peritoneal fibroblasts and excessive production of extracellular matrix components. No such effects has been observed for nifedipin (0.1 mg/mL). Therefore, the functional activity of peritoneal fibroblasts can serve a test system for studying the pharmacodynamics of non-dihydropyridine CCBs.

Keywords: slow calcium channel blocker; fibroblasts; hydroxyproline; hyaluronic acid.