

3. Zhivotova E.Yu., Lebedko O.A., Fleishman M.Yu., et al. Regulatory peptides participation in regulation of gastric mucous tissue homeostasis // Far Eastern Medical Journal. – 2013. – № 1. – P. 101-105.
4. Zhivotova E.Yu., Maslennikova N.V., Fleishman M.Yu., et al. NOS-NO system as a universal link providing gastroprotective effects of opioid peptides // Far Eastern Medical Journal. – 2011. – № 4. – P. 83-86.
5. Merchiyeva S.A. The effect of short glyprolines with N- or C- end attached aminoacid residues of arginine or leucine on the resistance of gastric mucosa to the effect of stress // Proceedings of the «Lomonosov-2010» International Youth Forum / managing editors: Aleshkovsky I.A., Kostylev P.N., Andreyev A.I., Andriyanov A.V. [URL] – M.: MAX Press, 2010. – P. 279-280. – Access mode: http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2010/02.pdf.
6. Samonina G.E., Kopylova G.N., Umarova B.A., et al. Some mechanisms of antiulcerative effects of glyprolines // Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry. – 2011. – Vol. 9, № 4. – P. 58-64.
7. Sangadzhieva A.D., Bakayeva Z.V., Samonina G.E., et al. The change of cytokine profile of rats in protective antiulcerative effects of glyprolines. Impact of glyprolines (PGP и N-Acetyl-PGP) on cytokines gene expression in ethanol-induced erosion of the stomach // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – Series 16. – 2013. – № 2. – P. 7-11.
8. Trukhan D.I. The choice of a non-steroidal anti-inflammatory drug from the perspective of prevention NSAID-gastropathy and drug safety // Consilium Medicum. – 2014. – Vol. 16, № 8. – P. 34-39.
9. Falaleyeva T.M., Samonina G.E., Beregovaya T.V., et al. The effect of PGP, GP, PG glyprolines on homeostasis of gastric mucosa in rats with ethanol-induced gastric ulcers // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2010. – Vol. 149, № 6. – P. 637-639.
10. Fleishman M.Yu., Tolstenok I.V., Lebedko O.A., et al. Effects of glyprolines on DNA synthesis and free radical oxidation in mouse gastric mucosa under physiological conditions and during therapy with non-steroidal anti-inflammatory drugs // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2015. – Vol. 159, № 4. – P. 500-503.
11. Khotimchenko M.Yu., Razina T.G., Shilova N.V., et al. Prophylactic effect of calcium alginate in case of indomethacin-induced injuries of rats' stomach mucous membrane // Pacific Medical Journal – 2007. – № 4. – P. 42-44.
12. Laine L., Kivitz A.J., Bello A.E. Double-blind randomized trials of single-tablet ibuprofen/high-dose famotidine vs. ibuprofen alone for reduction of gastric and duodenal ulcers // American Journal of Gastroenterology. – 2012. – Vol. 107, № 3. – P. 379-386.
13. Svintsitskiy A. NSAID-gastropathy: current state of the problem // Crimean therapeutic journal. – 2010. – Vol. 2, № 2 (15). – P. 280-286.
14. Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S., et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling // Free Radical Biology and Medicine. – 2008. – Vol. 45, № 1. – P. 18-31.

Координаты для связи с авторами: Толстенков Иван Владимирович – соискатель ЦНИЛ ДВГМУ, тел. 8-(4212)-32-99-64, e-mail: toiv@bk.ru; Брагина Валентина Владимировна – научный сотрудник ЦНИЛ ДВГМУ, тел. 8-(4212)-32-99-64, e-mail: valent.bragina@ya.ru; Флейшман Марина Юрьевна – д-р мед. наук, доцент, зав. ЦНИЛ ДВГМУ, тел. 8-(4212)-32-99-64, e-mail: marfl@yandex.ru.



УДК 615.22:616-007.274-085:611.018.2

С.В. Скальский, Т.Ф. Соколова

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРОВ МЕДЛЕННЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ ВЕРАПАМИЛА И ДИЛТЕАЗЕМА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА ФИБРОБЛАСТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРПЛАЗИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ СПАЙКООБРАЗОВАНИИ

*Омский государственный медицинский университет,
644099, ул. Ленина, 12, e-mail: pharm@omsk-osma.ru, г. Омск*

Резюме

Изучено влияние блокаторов медленных кальциевых каналов верапамила и дилтиазема на интенсивность процессов пролиферации и апоптоза фибробластов в условиях гиперплазии соединительной ткани при спайкообразовании. Исследования проведены в первичной культуре перитонеальных фибробластов крыс с гемоперитонеумом. Установлено, что при индукции спаечного процесса в брюшной полости крыс происходит усиление процессов пролиферации фибробластов, сопровождающееся активацией фактора транскрипции NF-κB, приводящей к блоки-

рованию процессов апоптоза. Интенсификация процессов пролиферации и ингибции апоптоза реализовалась 5,3-кратным увеличением митотической активности фибробластов, 8-кратным увеличением уровня ядерной формы NF-κB. БМКК верапамил (0,0001 мг⁻¹) и дилтиазем (0,0001 мг⁻¹) оказывали выраженный фармакологический эффект в отношении избыточной активности перитонеальных фибробластов, снижая уровень пролиферации клеток и активность ядерного фактора транскрипции NF-κB. Наиболее выраженным (в среднем в 2 раза) модулирующим эффектом обладал верапамил.

Ключевые слова: спайкообразование, верапамил, дилтиазем, пролиферация, ядерный фактор транскрипции NF-κB.

S.V. Skalsky, T.F. Sokolova

EFFECT OF VERAPAMIL AND DILTIAZEMUM CALCIUM CHANNEL BLOCKING AGENTS ON PROLIFERATION INTENSITY AND APOPTOSIS OF FIBROBLASTS IN HYPERPLASIA OF CONNECTIVE TISSUES IN ADHESIONS

Omsk State Medical University, Omsk

Summary

The authors studied the effect of verapamil and diltiazemum calcium channel blockers on proliferation intensity and apoptosis of fibroblasts in hyperplasia of connective tissues in adhesions. The studies were conducted in the primary cultures of peritoneal fibroblasts from rats with hemoperitoneum. It was detected that in adhesion process, induction in the abdominal cavity of rats proliferation of fibroblasts was reinforced, accompanied by transcription factor NF-κB activation leading to apoptosis blocking.

Proliferation intensity and apoptosis inhibition were carried out by 5,3-fold increase of fibroblast mitotic activity, and 8-fold increase of nuclear factor NF-κB. Verapamil CCBA (0.0001 ml⁻¹) and diltiazemum (0.0001 ml⁻¹) provided a pronounced pharmacological effect on extra activity of peritoneal fibroblasts, reducing a level of cell proliferation and activity of nuclear transcription factor NF-κB. Verapamil demonstrated the most pronounced (on an average in 2 times) modulating effect.

Key words: adhesions, verapamil, diltiazemum, proliferation, nuclear transcription factor NF-κB.

Одной из основных проблем современной хирургии и гинекологии остается спаечная болезнь [1, 2]. Несмотря на современные достижения в настоящее время не существует надежных средств ее предотвращения [3, 4]. В последнее время особое внимание уделяется влиянию антагонистов кальция на процессы фиброгенеза при избыточном росте соединительной ткани. Значимыми являются данные литературы о положительном эффекте блокаторов медленных кальциевых каналов (БМКК) в качестве средства для профилактики и лечения спайкообразования. Известно, что применение БМКК в эксперименте уменьшает обра-

зование послеоперационных спаек путем ингибирования пролиферации фибробластов [8, 13, 14]. Доказано действие БМКК на ядерный фактор транскрипции NF-κB, блокирующий апоптоз [7, 10, 11, 12]. Однако, данные о влиянии различных препаратов БМКК на процессы фиброгенеза немногочисленны, противоречивы и требуют дальнейших исследований [6, 7, 11].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния БМКК верапамила и дилтиазема на интенсивность процессов пролиферации и апоптоза фибробластов в условиях гиперплазии соединительной ткани при спайкообразовании.

Материалы и методы

Основу работы составили результаты исследований, выполненных в первичной культуре перитонеальных фибробластов крыс, которым для индукции фибропластических процессов в брюшной полости моделировался гемоперитонеум путем введения аутокрови [5]. Эксперименты выполнены на 54 лабораторных белых крысах-самцах массой 200-240 граммов. Животные содержались в обычных условиях вивария, регламентируемых приказом МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 г. Опыты проводили в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.77 и № 701 от 27.07.78 об обеспечении принципов гуманного обращения с экспериментальными животными. На 10 сутки гемоперитонеума, при развитии спаечного процесса в брюшной полости, сразу после эвтаназии животного, брюшную полость промывали 10 мл среды RPMI-1640 с антибиотиками и 10 % раствором гепарина через прокол в каудальной трети белой линии живота. Клетки из перитонеальных смывов трижды отмывали ростовой средой: RPMI-1640 («Sigma») с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 % глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина и доводили концентрацию до 2×10⁶/мл. Суспензию клеток делили на одинаковые

пулы и помещали в чашки Петри диаметром 40 мм половина которых, для подсчета пролиферативной активности фибробластов, была со стеклами, покрытыми синтетическим аналогом внеклеточного матрикса поли-D-лизином. В 1-й группе опытов активированные *in vivo* фибробласты крыс с гемоперитонеумом культивировались в ростовой среде без добавления лекарственных средств. Во 2-й группе к суспензии активированных клеток добавляли 0,1 мг/мл верапамила производства ОАО «Биосинтез», г. Пенза, Россия. В 3-й группе активированные клетки культивировали с дилтиаземом (0,1 мг/мл). Контролем служил пул неактивированных клеток, полученный от интактных крыс. Клетки инкубировали 24 часа (37 °С, 5 % CO₂). Покровные стекла окрашивали по Романовскому-Гимза. Микроскопию мазков проводили с помощью бинокулярного светового микроскопа «Zeiss» (Германия) при иммерсионном увеличении ×1000. Пролиферативную активность фибробластов оценивали по количеству клеток с морфологическими признаками митозов. Оценку митотической активности фибробластов проводили путем определения митотического индекса (МИ) по формуле: $p/N \times 100 \%$, где n – число клеток, вступивших в митоз,

N – общее количество клеток. Для приготовления ядерных экстрактов и определения содержания в них NF-κB (p50/p65) клетки собирали и промывали холодным PBS, концентрировали центрифугированием. Полученный осадок ресуспендировали в гипотоническом буфере, инкубировали на льду 15 минут, затем добавляли детергент NP40 и центрифугировали при 4 °C (3 000 об. мин, 10 минут). Осадок суспендировали в 50 мкл экстракционного буфера в присутствии ингибиторов протеиназ (30 мин) и центрифугировали при 4 °C (13 000 об./мин.,

30 мин.). Супернатант (ядерная фракция) хранили до измерения при -80 °C. Определение NF-κB проводили методом иммуноферментного анализа, используя наборы реагентов BCM Diagnostics (США). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6,0 с анализом характера распределения полученных данных по критерию Шапиро – Уилка и использованием t-критерия Стьюдента. Различия величин показателей считали достоверными при p<0,05.

Результаты и обсуждение

Данные, характеризующие средние величины исследованных показателей пролиферативной активности перитонеальных фибробластов крыс с гемоперитонеумом и регуляции апоптоза в клеточных культурах, представлены в таблице. Пролиферативная активность перитонеальных фибробластов крыс с гемоперитонеумом в 1-й группе активированных фибробластов через 1 сутки культивирования была высокой, митотический индекс превышал аналогичные показатели в группе контроля (не активированные фибробласты) в 5,3 раза. Введение верапамила в культуру клеток (2-я группа) предотвращало чрезмерную активацию фибробластов: митотическая активность клеток снизилась на 58,5 % от уровня митотического индекса в культуре активированных фибробластов без добавления лекарственных средств (1-я группа). Внесение дилтиазема в ростовую среду клеток 3-й группы вызывало менее значимое, в сравнении с верапамилем, уменьшение пролиферативного ответа активированных фибробластов. Митотический индекс в 3-й группе с дилтиаземом был ниже значений 1-й группы (без лекарственных средств) на 23,6 %. Сравнительный анализ пролиферативной активности фибробластов во 2-й и 3-й группах выявил достоверное различие показателей. Нормализующий эффект дилтиазема был менее выражен: значения митотического индекса фибробластов при действии дилтиазема были почти в 2 раза ниже, чем при действии верапамила.

(p50/p65) в первичной культуре перитонеальных фибробластов крыс с гемоперитонеумом и фибробластов интактных животных (контроль), а также влиянию классических БМКК верапамила и дилтиазема на его активность, количество ядерного фактора транскрипции NF-κB в образцах лизата ядер клеток контрольных культур не превышало минимальной, определяемой параметрами тест-системы концентрации (150 пг/мл). В ядерных лизатах культур активированных клеток, содержание NF-κB было выше, чем в контроле в 8 раз. Активность NF-κB (p50/p65) в культурах активированных фибробластов (1-я группа) без добавления БМКК в инкубационную среду, а также при добавлении в культуру клеток раствора верапамила (2-я группа) и дилтиазема (3-я группа) была различной. Введение верапамила (2-я группа) предотвращало чрезмерную активацию ядерного фактора транскрипции фибробластов: уровень NF-κB в ядерных лизатах культур снизился на 28,3 %. Добавление дилтиазема (3-я группа) в культуру клеток вызывало статистически значимое, но менее выраженное в сравнении с верапамилем, уменьшение активированного NF-κB. Его уровень в 3-й группе был ниже значений 1-ой группы на 15,1 %. Сравнительный анализ уровней активированного NF-κB во 2-й и 3-й группах также выявил достоверное различие показателей.

Таким образом, результаты исследований *in vitro* позволяют утверждать, что при индукции спаечного процесса в брюшной полости крыс путем моделирования гемоперитонеума наблюдалось усиление процессов пролиферации фибробластов, сопровождающееся активацией фактора транскрипции NF-κB, приводящей к блокированию процессов апоптоза. Интенсификация процессов пролиферации реализовалась 5,3-кратным увеличением митотической активности фибробластов, активация фактора транскрипции NF-κB – 8-кратным увеличением уровня ядерной формы NF-κB. Исследование не описанного ранее фармакологического действия БМКК на клетки соединительной ткани показало, что верапамил (0,0001 мг⁻¹) и дилтиазем (0,0001 мг⁻¹) оказывали нормализующее влияние на чрезмерную пролиферативную активность фибробластов и ядерного фактора NF-κB при индукции спаечного процесса. Наиболее выраженным (в среднем в 2 раза) модулирующим эффектом обладал верапамил.

Таблица

Морфофункциональные показатели перитонеальных фибробластов (M±m)

Показатели	Группы			
	контроль	1-я	2-я	3-я
Митотический индекс (МИ)	2,3±0,2	12,3±0,4#	5,1±0,1*	9,4±0,3*^
% снижения МИ от уровня 1-й группы			58,5%	23,6%
NF-κB (пг/мл)	84,2±27,6	671,7±21,3#	482,4±26,5*	570,5±21,8*^
% снижения NF-κB от уровня 1-й группы			28,3%	15,1%

Примечание. # – достоверность различий показателей группы 1 и контроля, * – группы 1 и 2, * – группы 1 и 3, ^ – группы 2 и 3, p<0,05.

Согласно представленным в таблице данным по экспрессии транскрипционного фактора NF-κB

Выводы

1. Моделирование гемоперитонеума на этапе образования спаек сопровождается повышением (в среднем 6,6-кратное) пролиферации фибробластов и активности ядерного фактора транскрипции NF-κB,

приводящего к ингибированию процессов апоптоза.

2. Верапамил (0,0001 мг⁻¹) тормозит чрезмерную митотическую и антиапоптотическую активность перитонеальных фибробластов.

3. Дилтиазем (0,0001 мл⁻¹) оказывает менее значимый (в среднем в 2 раза), чем верапамил в той же дозе,

нормализующий эффект на функциональные показатели фибробластов.

Литература

1. Бойко В.В., Тарабан И.А., Евтушенко Д.А. и др. Современное состояние вопроса острой спаечной кишечной непроходимости // Харьковська хірургічна школа. – 2014. – № 1 (64). – С. 87-90.

2. Дронов А.И., Задорожная К.О., Дронова В.Л., Насташенко М.И. Патогенез, осложнения и контроль перитонеального спаечного процесса в гинекологии и хирургии // Хирургия. Восточная Европа. – 2015. – № 2 (14). – С. 124-129.

3. Лаврешин П.М., Гобеджишвили В.В., Келасов И.Г. Прогнозирование и профилактика развития внутрибрюшных спаек. – Saarbrücken, 2012. – 148 с.

4. Ляхова А.В. Пути профилактики послеоперационного спайкообразования брюшной полости // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2010. – Т. 3, № 1. – С. 72-81.

5. Скальский С.В., Шамрай Г.А. Способ моделирования внутрибрюшинных спаек // Патент России № 2260854, 2005, Бюл. № 26.

6. Ishii N., et al. Anti-atherosclerotic potential of dihydropyridine calcium channel blockers // Journal of atherosclerosis and thrombosis. – 2012. – Vol. 19, № 8. – P. 693-704.

7. Kawamura A., et al. Azelnidipine, Not Amlodipine, Induces Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor From Smooth Muscle Cells and Promotes Endothelial Tube Formation // Cardiology Research. – 2014. – Vol. 5, № 5. – P. 145-150.

8. Li Y., Ma X., Yu P., et al. Intra-articular adhesion reduction after knee surgery in rabbits by calcium channel blockers // Med Sci Monit. – 2014. – № 20. – P. 2466-2471.

9. Li Y., et al. BK Channels Regulate Myometrial Contraction by Modulating Nuclear Translocation of NF-κB // Endocrinology. – 2014. – Vol. 155, № 8. – P. 3112-3122.

10. Liang S.J., et al. Inhibition of Orail Store-Operated Calcium Channel Prevents Foam Cell Formation and Atherosclerosis // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. – 2016. – Vol. 36, № 4. – P. 618-628.

11. Ohya S., et al. Recent advances in therapeutic strategies that focus on the regulation of ion channel expression // Pharmacology & therapeutics. – 2016. – Vol. 160. – P. 11-43.

12. Suzuki Y., Inoue T., Ra C. Calcium signaling in mast cells: Focusing on L-type calcium channels // Calcium Signaling. – Springer Netherlands, 2012. – P. 955-970.

13. Wang R., Mao Y., Zhang Z., et al. Role of verapamil in preventing and treating hypertrophic scars and keloids // Int Wound J. – 2015. – doi: 10.1111/iwj.12455.

14. Wang Z., Wang Y., Xie P., et al. Calcium channel blockers in reduction of epidural fibrosis and dural adhesions in laminectomy rats // Eur J Orthop Surg Traumatol. – 2014. – Vol. 24, № 1. – P. 293-298.

Литература

1. Boyko V.V., Taraban I.A., Yevtushenko D.A., et al. The present state of acute adhesive intestinal obstruction // Kharkov Surgical School – 2014. – № 1 (64). – P. 87-90.

2. Dronov A.I., Zadorozhnaya K.O., Dronova V.L., Nastashenko M.I. Pathogenesis, consequences and control of peritoneal adhesions in gynecologic surgery // «Surgery. East Europe». – 2015. – № 2 (14). – P. 124-129.

3. Lavreshin P.M., Gobedzhishvili V.V., Kelasov I.G. Prognosis and prevention of the development of intraperitoneal adhesions. – Saarbrücken, 2012. – 148 p.

4. Lyakhova A.V. Methods of prevention of postoperative peritoneal adhesions formation // Bulletin of Experimental and Clinical Surgery. – 2010. – Vol. 3, № 1. – P. 72-81.

5. Skalsky S.V., Shamrai G.A. A method of intraperitoneal adhesions modelling // Patent of Russia № 2260854. – 2005, Bul. № 26.

6. Ishii N., et al. Anti-atherosclerotic potential of dihydropyridine calcium channel blockers // Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. – 2012. – Vol. 19, № 8. – P. 693-704.

7. Kawamura A., et al. Azelnidipine, Not Amlodipine, Induces Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor From Smooth Muscle Cells and Promotes Endothelial Tube Formation // Cardiology Research. – 2014. – Vol. 5, № 5. – P. 145-150.

8. Li Y., Ma X., Yu P., et al. Intra-articular adhesion reduction after knee surgery in rabbits by calcium channel blockers // Med Sci Monit. – 2014. – № 20. – P. 2466-2471.

9. Li Y., et al. BK Channels Regulate Myometrial Contraction by Modulating Nuclear Translocation of NF-κB // Endocrinology. – 2014. – Vol. 155, № 8. – P. 3112-3122.

10. Liang S.J., et al. Inhibition of orail store-operated calcium channel prevents foam cell formation and atherosclerosis // arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. – 2016. – Vol. 36, № 4. – P. 618-628.

11. Ohya S., et al. Recent advances in therapeutic strategies that focus on the regulation of ion channel expression // Pharmacology & therapeutics. – 2016. – Vol. 160. – P. 11-43.

12. Suzuki Y., Inoue T., Ra C. Calcium signaling in mast cells: Focusing on L-type calcium channels // Calcium Signaling. – Springer Netherlands, 2012. – P. 955-970.

13. Wang R., Mao Y., Zhang Z., et al. Role of verapamil in preventing and treating hypertrophic scars and keloids // Int Wound J. – 2015. – doi: 10.1111/iwj.12455.

14. Wang Z., Wang Y., Xie P., et al. Calcium channel blockers in reduction of epidural fibrosis and dural adhesions in laminectomy rats // Eur J Orthop Surg Traumatol. – 2014. – Vol. 24, № 1. – P. 293-298.

Координаты для связи с авторами: Скальский Сергей Викторович – канд. мед. наук, зав. кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии, e-mail: sergscalskiy@mail.ru, тел.: сот. +7-913-601-22-11, раб. 8-(3812)-24-79-27; Соколова Татьяна Федоровна – д-р мед. наук, ассистент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии, e-mail: pharm@omsk-osma.ru, тел. 8-(3812)-24-79-27.