

## ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БЛОКАТОРОВ МЕДЛЕННЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ОБРАЗОВАНИЯ ВНУТРИБРЮШНЫХ СПАЕК

Татьяна Фёдоровна Соколова, Сергей Викторович Скальский\*, Надежда Ефимовна Турок

Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия

Поступила 13.07.2016; принята в печать 29.11.2016.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-218

**Цель.** Изучить возможность применения известных используемых в кардиологии лекарственных средств, блокаторов медленных кальциевых каналов — производных фенилалкиламина (верапамил), бензодиазепина (дилтиазема), дигидропиридина (нифедипина) для профилактики перитонеального образования спаек.

**Методы.** Изучение действия различных концентраций препаратов на ядерную транслокацию *NF-κB*, пролиферативную и коллагенсинтетическую активность фибробластов проведено в первичной культуре перитонеальных фибробластов крыс с гемоперитонеумом. Асептическое повреждение брюшины вызывали моделированием аутогемоперитонеума по оригинальной методике.

**Результаты.** Установлено, что верапамил и дилтиазем оказывали нормализующее влияние на ядерную транслокацию *NF-κB*, процессы пролиферации фибробластов, синтез ими коллагена путём оптимизации функциональной активности фибробластов при индукции спаечного процесса. Верапамил и дилтиазем оказывали одинаковое по направленности, но разное по выраженности действие на фибробласты. Верапамил в концентрациях 0,05 и 0,1 мг/мл и дилтиазем в концентрации 0,1 мг/мл подавляли чрезмерную активность фибробластов, ингибируя их пролиферативную, коллагенсинтетическую активность, ядерную транслокацию *NF-κB*. Наибольшим фармакологическим эффектом обладал верапамил. У нифедипина данный эффект выявлен не был. На молекулярном уровне показано ингибирующее влияние блокаторов медленных кальциевых каналов верапамила и дилтиазема на активацию блокирующего апоптоз ядерного фактора транскрипции *NF-κB*.

**Вывод.** Верапамил и дилтиазем могут быть рекомендованы к дальнейшим углублённым исследованиям в эксперименте и клинике, направленным на расширение спектра биологической активности известных лекарственных препаратов и области их клинического применения.

**Ключевые слова:** антагонисты кальциевых каналов, спайкообразование, фибробласты, крысы.

### EVALUATION OF THE POSSIBILITY TO USE CALCIUM CHANNEL BLOCKERS FOR PREVENTION OF INTRA-ABDOMINAL ADHESIONS FORMATION

T.F. Sokolova, S.V. Skal'skiy, N.E. Turok

Omsk State Medical University, Omsk, Russia

**Aim.** To study the possibility of the use of known medications used in cardiology — calcium channel blockers — derivatives of phenylalkilamine (verapamil), benzodiazepine (diltiazem), dihydropyridine (nifedipine) — for prevention of peritoneal adhesion formation.

**Methods.** The study of the effect of different concentrations of medications on nuclear translocation of *NF-κB*, proliferative and collagen-synthetic activity of fibroblasts was conducted in the primary culture of rats peritoneal fibroblasts with hemoperitoneum. Aseptic injury of peritoneum was caused by modeling of autohemoperitoneum according to original method.

**Results.** It was found that verapamil and diltiazem normalized nuclear translocation of *NF-κB*, processes of fibroblasts proliferation and their collagen synthesis by optimizing fibroblast functional activity during adhesion formation induction. Verapamil and diltiazem affected fibroblasts similarly but with different intensity. Verapamil in concentrations 0.05 and 0.1 mg/ml and diltiazem in concentration 0.1 mg/ml suppressed the excessive fibroblast activity by inhibiting their proliferative and collagen-synthetic activity, nuclear translocation of *NF-κB*. Verapamil demonstrated the most prominent pharmacological effect. Nifedepine did not reveal such effect. At the molecular level inhibiting effect of calcium channel blockers verapamil and diltiazem on the activation of apoptosis blocking nuclear transcription factor *NF-κB* was demonstrated.

**Conclusion.** Verapamil and diltiazem can be recommended for further detailed experimental and clinical studies focused on widening of biological activity spectrum of known medications and area of their clinical use.

**Keywords:** calcium channel blockers, adhesion formation, fibroblasts, rats.

Поиск новых областей использования уже применяемых лекарственных препаратов имеет ряд преимуществ перед внедрением новых органических соединений: уже определены их физико-химические свойства, изучены метаболические превращения и пути элиминации из организма, известны острая и хроническая токсичность, эмбриотоксичность, отрицательные побоч-

ные эффекты и пути их снижения. Всё вышперечисленное делает область изучения новых фармакологических свойств известных препаратов чрезвычайно привлекательной и экономически выгодной [1, 2].

Обнаружено, что широко используемые в кардиологической практике блокаторы медленных кальциевых каналов (БМКК) обладают гораздо более широким спектром фармакологической активности, чем предполагали ранее. У БМКК описано наличие

фармакологических эффектов, реализуемых модификацией функциональной активности фибробластов и образующейся соединительной ткани [3, 4]. Так, местное и внутрисуставное применение БМКК верапамила в эксперименте уменьшает образование послеоперационных спаек путём ингибирования пролиферации фибробластов [4, 5].

На молекулярном уровне показано ингибирующее влияние БМКК нифедипина, верапамила и эфонидипина на активацию блокирующего апоптоз ядерного фактора транскрипции *NF-κB* [6, 7]. Это влияние опосредовано колебаниями внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ , влекущими изменение активности множества внутриклеточных ферментов и белков [8].

Однако литературные данные, свидетельствующие о наличии у БМКК фармакологических эффектов в отношении функциональной активности фибробластов — клеток-эффекторов при построении соединительнотканых спаек, немногочисленны. Механизмы действия антагонистов кальция на процессы фиброгенеза остаются недостаточно изученными, следовательно, и возможность применения БМКК в клинике для профилактики образования спаек требует дальнейших исследований.

Цель исследования — оценка возможности применения известных, используемых в кардиологии, лекарственных средств, БМКК — производных фенилалкиламина (верапамила), бензотиазепина (дилтиазема), дигидропиридина (нифедипина) — для профилактики образования спаек с учётом эффективности действия различных доз препаратов на ядерную транслокацию *NF-κB*, пролиферативную и коллагенсинтетическую активность фибробластов.

В основу экспериментального изучения новых свойств БМКК по предотвращению чрезмерного образования соединительной ткани при развитии спаечного процесса легло моделирование внутрибрюшинных спаек путём введения в брюшную полость 48 лабораторным крысам с массой тела 220–240 г аутокрови [9] с выделением на 10-е сутки асептического воспаления брюшины перитонеальных клеток для проведения исследований в первичной культуре.

Эксперименты проведены в соответствии с принципами, изложенными в «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей» (г. Страсбург, Франция, 1986), и согласно правилам лабораторной

практики Российской Федерации (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации №267 от 19.06.2003).

Объектом исследования служили активированные перитонеальные фибробласты. Клетки получали через прокол в каудальной трети белой линии живота, промывая брюшную полость 10 мл среды RPMI-1640 с антибиотиками и 10% раствором гепарина. Образцы перитонеальных смывов трижды отмывали ростовой средой следующего состава: RPMI-1640 («Sigma»), 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% глутамина, 100 ЕД/мл бензилпенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина. После подсчёта клеток их концентрацию доводили до  $2 \times 10^6$ /мл.

Полученные суспензии делили на четыре одинаковых пула, составляющих исследовательские группы, и помещали в чашки Петри диаметром 40 мм с покровными стёклами, покрытыми синтетическим аналогом внеклеточного матрикса поли-D-лизином. Клетки культивировали 24 ч при температуре 37 °С и в атмосфере 5%  $CO_2$ . Первую группу клеток культивировали в ростовой среде RPMI-1640 без добавления лекарственных средств. В параллельных исследованиях в суспензию клеток второй группы добавляли раствор верапамила (производства ОАО «Биосинтез», г. Пенза, Россия), третьей группы — дилтиазема (производства компании Hospira), четвёртой группы — нифедипина (адалата производства компании Bayer, Германия) в концентрациях 0,05 и 0,1 мг/мл. Контролем служили клеточные культуры неактивированных фибробластов (пятая группа), полученные от 10 интактных крыс.

Пролиферативную активность фибробластов оценивали по количеству клеток с морфологическими признаками митозов путём определения митотического индекса (МИ) по формуле  $n/N \times 100\%$ , где  $n$  — число клеток, вступивших в митоз;  $N$  — общее количество клеток (световая микроскопия, окраска по Романовскому–Гимзе).

Апоптотическую активность определяли по содержанию ядерного фактора транскрипции *NF-κB* (p50/p65) в лизатах клеток методом твердофазного иммуноферментного анализа (BCM Diagnostics, США).

Приготовление ядерных экстрактов клеток проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя наборов. Содержание оксипролина в супернатантах клеточных культур определяли по методике [10]. Степень стимуляции коллагена

Морфофункциональные показатели перитонеальных фибробластов

Группы	Концентрации лекарственных средств, мг/мл	Митотический индекс, %	Оксипролин, мкмоль/л	<i>NF-κB</i> , пг/мл
Контрольная	—	2,3±0,2	6,5±0,4	84,2±27,6
Первая (без добавления лекарственных средств)	—	12,3±0,4#	26,7±1,7#	671,7±21,3#
Вторая (верапамил)	0,05	8,2±0,3*	12,6±0,9*	565,1±16,7*
	0,1	5,1±0,1*^	8,9±0,2*^	482,4±26,5*^
Третья (дилтиазем)	0,05	11,7±0,4	18,9±1,2*	650,5±31,2
	0,1	9,4±0,3*^	14,3±1,1*^	570,5±21,8*
Четвёртая (нифедипин)	0,05	12,4±0,5	25,9±2,9	677,9±30,3
	0,1	11,5±0,3	23,1±0,5	607,9±32,2

Примечание. Результаты представлены в виде  $M \pm m$ . Статистическая значимость различий ( $p < 0,05$ ): #при сравнении с контролем; \*при сравнении с первой группой, ^между группами с концентрациями лекарственных средств 0,05 и 0,1 мг/мл.

ногенеза в культуре клеток оценивали по количеству белковосвязанного оксипролина, рассчитанного по разности содержания свободного и суммарного оксипролина.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета статистических программ Statistica 6.0. В зависимости от вида распределения результаты представлены как  $M \pm m$ , где  $M$  — среднее выборочное,  $m$  — ошибка среднего. Статистическую значимость различий ( $p < 0,05$ ) исследовали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента.

Данные культуральных исследований представлены в табл. 1. Анализ действия БМКК на функциональную активность перитонеальных фибробластов показал, что у фибробластов, полученных от крыс, перенёвших гемоперитонеум, экспрессия транскрипционного фактора *NF-κB* ( $p50/p65$ ), пролиферативная и коллагенсинтетическая активность были высокими. Содержание *NF-κB* в культуре активированных фибробластов в 4,5 раза, уровень белковосвязанного оксипролина в 4,2 раза, МИ в 5,3 раза превышали показатели контроля ( $p < 0,05$ ).

Исследования зависимости влияния БМКК от их концентрации в среде культивирования фибробластов выявили, что производное фенилалкиламина верапамил (вторая группа) в концентрациях 0,05 и 0,1 мг/мл предотвращал чрезмерную активность фибробластов (см. табл. 1). Верапамил предотвращал ядерную транслокацию *NF-κB*, уровень которого в ядерных лизатах культур уменьшился на 15,8% при концентрации 0,05 мг/мл ( $p < 0,01$ ) и на 28,2% при концентрации 0,1 мг/мл ( $p < 0,001$ ). МИ во второй группе был ниже, чем в первой, на 33,3% при концентрации 0,05 мг/мл и на 22,0%

58,5% при концентрации 0,1 мг/мл. Количество белковосвязанного оксипролина в культуральной жидкости с верапамилем также было ниже на 53,8% при концентрации 0,05 мг/мл и на 66,7% при концентрации 0,1 мг/мл, чем в культуре клеток без лекарственных средств. Таким образом, выраженность влияния верапамила на функциональную активность перитонеальных клеток была пропорциональна концентрации препарата в среде культивирования.

Оценка фармакологического эффекта производного бензотиазепина дилтиазема в концентрациях 0,05 и 0,1 мг/мл в отношении избыточного роста соединительной ткани при образовании спаек и сравнительный анализ действия дилтиазема (третья группа) и верапамила (вторая группа) на перитонеальные фибробласты показали, что дилтиазем, хотя и снижает чрезмерную функциональную активность данных клеток соединительной ткани, но его нормализующее действие менее выражено, чем у верапамила (см. табл. 1). Добавление в ростовую среду дилтиазема (третья группа) в концентрации 0,1 мг/мл приводило к статистически значимому в сравнении с первой группой снижению активности ядерного фактора транскрипции *NF-κB*, уровней митозов, синтеза коллагена (см. табл. 1). Однако это снижение в третьей группе было менее значимо, чем во второй: различия показателей достигали 1,6-кратного (белковосвязанный оксипролин), 1,8-кратного (МИ), 1,2-кратного (*NF-κB*) уровня. При меньшей концентрации (0,05 мг/мл) дилтиазем не оказывал действия на фибробласты, достоверных различий в группах с дилтиаземом (третья группа) и без него (первая группа) не найдено (см. табл. 1).

Нифедипин (производное дигидропиридина) в концентрациях 0,05 и 0,1 мг/мл не оказывал действия на культуру активированных фибробластов, не влиял на пролиферативную, колагенсинтетическую активность клеток, ядерный фактор транскрипции *NF-κB*. Различия МИ, количества белковосвязанного оксипролина, *NF-κB* между группами с нифедипином (четвёртая группа) и без лекарственных средств (первая группа) не имели статистической значимости (см. табл. 1).

Таким образом, результаты исследований не описанного ранее фармакологического действия классических БМКК — производных фенилалкамина (верапамила), бензотиазепина (дилтиазема), дигидропиридина (нифедипина) — на механизмы избыточного формирования соединительной ткани при образовании спаек (регулирование функций фибробластов на клеточном и молекулярном уровне) показало, что верапамил и дилтиазем оказывали нормализующее влияние на процессы пролиферации и апоптоза фибробластов, синтеза ими коллагена путём оптимизации функциональной активности фибробластов при индукции спаечного процесса.

Верапамил и дилтиазем оказывали одинаковое по направленности, но разное по выраженности действие на фибробласты. Верапамил в концентрациях 0,05 и 0,1 мг/мл и дилтиазем в концентрации 0,1 мг/мл подавляли чрезмерную активность фибробластов, ингибируя их пролиферативную, колагенсинтетическую активность, ядерную транскрипцию *NF-κB*. Наибольшим фармакологическим эффектом обладал верапамил. У нифедипина данный эффект выявлен не был.

Результаты фармакологических испытаний свидетельствуют о том, что верапамил и дилтиазем могут быть рекомендованы к дальнейшим углублённым исследованиям в эксперименте и клинике, направленным на расширение спектра биологической активности известных лекарственных препаратов.

## ВЫВОДЫ

1. У блокаторов медленных кальциевых каналов — производных фенилалкамина (верапамила), бензотиазепина (дилтиазема), — традиционно используемых в кардиологии, выявлены новые свойства по регуляции на молекулярном и клеточном уровнях функциональной активности фибробластов при образовании спаек.

2. При сравнительном количественном изучении ингибирующего действия блокаторов медленных кальциевых каналов в равных концентрациях на ядерную транскрипцию *NF-κB*, пролиферативную и колагенсинтетическую активность фибробластов верапамил демонстрировал наиболее выраженный эффект. Вектор активности дилтиазема тот же, однако выраженность эффекта достоверно ниже. У нифедипина данный эффект отсутствовал.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Погребняк А.В. Изучение новых свойств известных лекарственных препаратов. Теоретическое обоснование, получение и исследование новых дезагрегантов на основе известных лекарственных препаратов. *Фармация и фармакология*. 2013; (1): 8–17. DOI: 10.19163/2307-9266-2013-1-1-8-17. [Pogrebnyak A.V. Exploring new properties known drugs. report i. theoretical explanation as to obtaining and investigation of new disaggregants based on known drugs. *Farmatsiya i farmakologiya*. 2013; (1): 8–17. DOI: 10.19163/2307-9266-2013-1-1-8-17. (In Russ.)]
2. Поснов И.А. Прогнозирование новых свойств дибунла, пропофола, клопидогреля, триметоприма, метилурацила и ацетилсалициловой кислоты. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2007; 9 (2): 127. [Posnov I.A. Prediction of new properties of dibunol, propofol, clopidogrel, trimethoprim, methyluracil and acetylsalicylic acid. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*. 2007; 9 (2): 127. (In Russ.)]
3. Avci P., Gupta A., Sadasivam M. et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 2013; 32 (1): 41–52.
4. 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): 2466–2471. DOI: 10.12659/MSM.892957.
5. 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; 24 (1): 293–298. DOI: 10.1007/s00590-013-1395-7.
6. Huang B.R., Chang P.-C., Yeh W.-L. et al. Anti-neuroinflammatory effects of the calcium channel blocker nifedipine on microglial cells: implications for neuroprotection. *PLoS one*. 2014; 9 (3): 1–10: e91167. DOI: 10.1371/journal.pone.0091167.
7. Kawamura A., Miura S.-I., Matsuo Y. et al. Azelnidipine, not Amlodipine, induces secretion of vascular endothelial growth factor from smooth muscle cells and promotes endothelial tube formation. *Cardiol. Res.* 2014; 5 (5): 145–150. DOI: 10.14740/cr352w.
8. Liang S.-J., Zeng D.-Y., Mai X.-Y. et al. Inhibition of Orai1 store-operated calcium channel prevents foam cell formation and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016; 36 (4): 618–628. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.307344.
9. Скальский С.В., Шамрай Г.А. *Способ моделирования внутрибрюшинных спаек*. Патент России №2260854. Бюлл. №26 от 20.09.2005. [Skal'skiy S.V., Shamray G.A. *A method of modeling of intraabdominal adhesion*. Patent of Russia for invention №2260854. Bulletin №26 issued at 20.09.2005. (In Russ.)]
10. Шараев П.Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови. *Лаборатор. дело*. 1990; (5): 283–285. [Sharaev P.N. A method of detection of free and conjugated oxiprolin in blood serum. *Laboratornoe delo*. 1990; (5): 283–285. (In Russ.)]