

Воздействие блокаторов медленных кальциевых каналов на функциональную активность перитонеальных клеток

С.В. Скальский¹, Т.Ф. Соколова¹, Д.А. Сычёв²

¹ – ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Омск

² – ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» МЗ РФ, Москва

Контактная информация: к.м.н. Скальский Сергей Викторович, sergscalskiy@mail.ru

Исследовали влияние блокаторов медленных кальциевых каналов – производных фенилалкиламина (верапамил), бензотиазепина (дилтиазем), дигидропиридина (нифедипин) на функции фибробластов и макрофагов в культуре клеток, активированных гемоперитонеумом. Установлено, что верапамил и дилтиазем снижают чрезмерную активность фибробластов и клеток микроокружения – мононуклеарных фагоцитов на стадии формирования спаек при гемоперитонеуме путем регуляции митотической активности перитонеальных фибробластов и макрофагальной трансформации моноцитов, ограничения избыточной продукции провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1. Наиболее эффективен верапамил: относительное уменьшение митотической активности фибробластов составляет 1,8 раза, макрофагальной трансформации моноцитов – в 1,3 раза, ограничение избыточной продукции TNF- α , IL-1 – в 1,5 и 2 раза соответственно выше, чем у дилтиазема. У нифедипина данный эффект отсутствует. Полученные результаты являются основанием для расширения представлений о фармакодинамике группы блокаторов медленных кальциевых каналов.

Ключевые слова: верапамил, дилтиазем, нифедипин, фибробласты, макрофаги.

Введение

Известна роль внутриклеточного ионизированного кальция (Ca^{2+}) в регуляции функции основных «строителей» соединительной ткани – фибробластов и клеток их микроокружения, а также хорошо изучена группа лекарственных средств, основной фармакодинамический эффект которых – снижение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме активно функционирующих клеток (блокаторы медленных кальциевых каналов (БМКК), или кальциевые антагонисты) [6, 10]. Литературные данные, свидетельствующие о наличии у БМКК фармакологических эффектов в отношении

функциональной активности фибробластов и макрофагов, неоднозначны и порой противоречивы [9, 11, 12]. С нашей точки зрения, они могут служить основанием для формулировки **цели** настоящего исследования, касающейся оценки влияния высокоспецифичных в отношении медленных кальциевых каналов групп препаратов БМКК: производных фенилалкиламина (верапамил), бензотиазепина (дилтиазем), дигидропиридина (нифедипин) на образование заместительной соединительной ткани путем регуляции функции фибробластов и макрофагов в культуре клеток на модели аутогемоперитонеума.

Материалы и методы

Оценку групп БМКК, которые представлены производными фенилалкиламина, бензотиазепина, дигидропиридина, в качестве регуляторов избыточного роста соединительной ткани проводили в культуре клеток.

Объектом исследования являлись активированные *in vivo*, при моделировании аутоперитонеума у крыс, фибробласты и макрофаги.

Исследования выполнены на 53 беспородных белых крысах массой 220-230 г, полученных из питомника Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). До и в период эксперимента животные контрольной и опытных групп содержались в виварии в одинаковых условиях: стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой на стандартном рационе, в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, Франция, 1986).

Для активирования перитонеальных клеток крысам в брюшную полость вводили аутокровь. На 10-е сутки после введения аутокрови проводилась оценка морфологических характеристик перитонеальных спаяк. 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. Образцы перитонеальных смывов центрифугировали при 800-1000 об/мин в течение 10 мин для осаждения клеточных элементов, которые затем трижды отмывали средой RPMI-1640 («Sigma») с добавлением 10% эмбриональной

телячьей сыворотки, 2% глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина. Количество клеток в среде определяли методом подсчета в камере Горяева и доводили концентрацию клеток до 2×10^6 /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 т.ч. и активированные макрофаги, и др. клетки, делили на четыре одинаковых пула, составляющих исследовательские группы, и помещали в чашки Петри диаметром 40 мм с покровными стеклами, покрытыми синтетическим аналогом внеклеточного матрикса поли-D-лизином. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, глутамина, пенициллина и стрептомицина. Клетки первого пула культивировали в данной питательной среде без добавления лекарственных средств (группа 1). В культуры клеток 2-ой – 4-ой опытных групп добавляли раствор верапамила (группа 2), дилтиазема (группа 3) и нифедипина (группа 4) в дозе 0,1 мг/мл. Контролем служили клеточные культуры неактивированных фибробластов (группа 5), полученные от интактных крыс. Клетки инкубировали 24 ч при 37°C и в атмосфере 5% CO₂. По окончании культивирования среду сливали, центрифугировали (1500 об/мин, 10 мин), в супернатантах определяли количество цитокинов. Покровные стекла промывали в растворе Хенкса, фиксировали, окрашивали по Романовскому-Гимза, подвергали цитологическому анализу

с оценкой пролиферативной активности моноцитов и макрофагов [1]. Пролиферативную активность фибробластов оценивали по количеству клеток с морфологическими признаками митозов. Оценку митотической активности фибробластов проводили путем определения митотического индекса по формуле: $n/N \times 100\%$, где n – число клеток, вступивших в митоз, N – общее количество клеток. Микроскопию мазков проводили с помощью бинокулярного светового микроскопа «Zeiss» (Германия) при иммерсионном увеличении $\times 1000$ (окуляр – $\times 10$, объектив – $\times 100$). В супернатантах клеточных культур определяли содержание фактора некроза опухолей альфа (TNF- α) и интерлейкина-1 β (IL-1). Определение уровня цитокинов проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением тест-систем на основе видоспецифических моноклональных антител фирмы «Иммунотех» (Франция) на планшеточном фотометре «Multiscan» (Финляндия).

Статистическую обработку результатов проводили 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 двух групп данных использовался t -тест (Стьюдента). Корреляционный анализ проводили с применением рангового коэффициен-

та корреляции Спирмена. Гипотезы различия считали статистически значимыми при значении уровня достоверности ниже 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Как показали наши исследования, пролиферативная активность неактивированных перитонеальных фибробластов и мононуклеарных фагоцитов в контрольной группе и активированных клеток без добавления лекарственных средств в культуральную среду (группа 1), а также при инкубации клеток с раствором верапамила (группа 2), дилтиазема (группа 3) и нифедипина (группа 4) была различной. Пролиферативная активность фибробластов группы 1 через сутки культивирования была высокой, митотический индекс превышал показатели контроля в 5,3 раза (табл.). Повышение пролиферативного ответа перитонеальных фибробластов крыс при гемоперитонеуме сочеталось с образованием в брюшной полости экспериментальных животных соединительнотканых спаек ($7,8 \pm 1,6$). Между показателем пролиферации фибробластов и числом спаек выявлено наличие сильной прямой корреляционной связи ($r = 0,9$; $p < 0,001$).

Исследование клеток микроокружения перитонеальных фибробластов (моноцитов и макрофагов) выявило, что моноциты в культуре клеток обладали высокой способностью к трансформации в макрофаги. Культивирование клеток системы мононуклеарных фагоцитов показало, что в течение 24 ч в среднем $60,5 \pm 3,1\%$ из них дифференцировалось в макрофаги, что в 2,5 раза превышало показатели контроля (табл.). Выявлено наличие прямой корреляци-

Таблица

**Морфофункциональные характеристики перитонеальных фибробластов
и макрофагов крыс с гемоперитонеумом**

Группа	Митотический индекс, %	MTM, %	TNF- α , пг/мл	IL-1, пг/мл
Контроль	2,3 $\pm$ 0,2	24,1 $\pm$ 5,2	17,1 $\pm$ 1,8	14,9 $\pm$ 2,1
1 (без препарата)	12,3 $\pm$ 0,4*	60,5 $\pm$ 3,1*	321,3 $\pm$ 21,1*	54,4 $\pm$ 4,2*
2 (верапамил)	5,1 $\pm$ 0,1**	36,2 $\pm$ 2,6**	97,4 $\pm$ 6,8**	27,1 $\pm$ 2,6**
3 (дилтиазем)	9,4 $\pm$ 0,3**	47,3 $\pm$ 2,9**	198,1 $\pm$ 10,1**	39,8 $\pm$ 2,3**
4 (нифедипин)	11,5 $\pm$ 0,3	56,1 $\pm$ 3,4	271,2 $\pm$ 14,5	47,4 $\pm$ 3,9

Примечание: * – достоверность различий показателей группы 1 и контроля, ** – достоверность различий показателей группы 1 и групп 2, 3, 4 ($p < 0,05$).

онной связи ($r=0,8$; $p < 0,01$) между показателем макрофагальной трансформации моноцитов (MTM) и числом спаек у крыс с аутогемоперитонеумом. Активированные макрофаги в процессе кооперативных клеточных взаимодействий, через систему цитокинов, оказывают значимое для течения и исхода продуктивного воспаления влияние на фибробласты.

Сравнительный анализ показателей уровня провоспалительных цитокинов в культуральной жидкости активированных (группа 2) и неактивированных (контроль) макрофагов и фибробластов выявил статистически значимое увеличение содержания провоспалительных цитокинов в культурах активированных клеток. Наиболее выраженные отклонения от контроля регистрировались при определении уровня TNF- α , который превышал контрольные значения в 19 раз (табл.). Это согласуется с имеющимися представлениями о биологическом действии данного цитокина [2, 5]. Известно, что TNF- α участвует не только в защитных реакциях, но и в процессах деструкции и репарации,

сопутствующих воспалению. При длительном хроническом воспалении именно TNF- α является одним из медиаторов повреждения тканей. Активация фиброгенеза, выраженная на этапах завершения воспаления в стадии пролиферации и репарации, также может быть связана со способностью TNF- α индуцировать пролиферацию фибробластов и депозицию коллагена. Высокая концентрация TNF- α влечет за собой хроническое воспаление, деструкцию, способствует неблагоприятному течению патологического процесса и является ключевым фактором в развитии спаечной болезни [7].

Наряду с резким усилением выработки TNF- α , который индуцирует биосинтез теми же макрофагами и, в меньшей степени, фибробластами IL-1, у крыс группы 1 наблюдалось изменение уровня IL-1, которое достигало 3,6-кратного увеличения по сравнению с контролем (табл.). Известно, что на этапе пролиферации и завершения процесса воспаления полным восстановлением или замещением дефекта соединительной ткани с последующим образованием рубца, выработка IL-1 макрофагами

угнетается. Однако при избыточном образовании рубцовой ткани наработка IL-1 продолжается. IL-1 индуцирует пролиферацию фибробластов и такие изменения их функционирования, которые способствуют развитию фиброза [4]. Формирование рубцов, связанное с повышенным образованием грануляционной ткани, под влиянием IL-1 усиливается [3]. В нашем исследовании связь изменений содержания цитокинов с выраженностью спайкообразования у экспериментальных животных подтверждена результатами корреляционного анализа. Прямая корреляционная зависимость обнаружена между содержанием TNF- α и числом спаек, IL-1 β и числом спаек с коэффициентами корреляции 0,55 ($p < 0,05$) и 0,87 ($p < 0,01$) соответственно.

Введение верапамила в культуру клеток (группа 2) предотвращало чрезмерную активацию фибробластов и клеток микроокружения моноцитарно-макрофагального ряда (табл.). Митотическая активность фибробластов в результате действия верапамила снизилась на 59%. Сопоставление числа перитонеальных моноцитов, трансформировавшихся в макрофаги в культуре клеток групп 1 и 2, продемонстрировало двукратное снижение их способности к трансформации при введении препарата. Исследование уровней TNF- α и IL-1 в группах сравнения выявило, что введение верапамила предотвращало повышение содержания данных цитокинов, останавливая наработку TNF- α на уровне $97,4 \pm 6,8$ пг/л ($p < 0,01$), ИЛ-1 – $27,1 \pm 2,6$ пг/л ($p < 0,01$), которые были в 2 и 3 раза соответственно ниже, чем в культуре активированных фибробластов и макрофагов без верапамила.

Добавление в культуральную среду дилтиазема (группа 3) – так же, как и в группе с верапамилем – сопровождалось снижением гиперактивности фибробластов и макрофагов, однако фармакологический эффект дилтиазема был менее выражен. Пролиферативный ответ фибробластов и моноцитарных фагоцитов при действии дилтиазема уменьшался лишь на 23,4% и 21,8% соответственно. При контакте клеток с верапамилем эффективность его воздействия на фибробласты и клетки микроокружения была в 2,5-2,7 раза выше. Снижение уровней цитокинов также было менее значимо, чем при действии верапамила. Содержание TNF- α и ИЛ-1 в культуральной жидкости группы 3 было ниже, чем в группе 1, но в два раза превышало аналогичные показатели группы 2. Инкубация клеток с нифедипином сопровождалась отсутствием фармакологического эффекта, исследованные показатели в группах 1 и 4 статистически не различались. Данные различия объясняются разной фармакологической активностью БМКК, производных фенилалкиламина, бензотиазепина, дигидропиридина, в отношении пролиферативной и белок-синтезирующей функций фибробластов и макрофагов, связанной, например, и с тем, что проникающие внутрь клетки-эффектора верапамил и дилтиазем, в отличие от нифедипина, имеют дополнительные рецепторы в мембране митохондрий [8].

Таким образом, сравнивая результаты действия высокоспецифичных в отношении медленных кальциевых каналов групп препаратов БМКК – производных фенилалкиламина (верапамил), бензотиазепина (дилтиазем), дигидропиридина (нифедипин) на функции активированных перитонеальных фибробластов

и макрофагов крыс с аутогемоперитонеумом в культуре клеток, можно считать, что наибольшей фармакологической эффективностью обладал верапамил. Под действием верапамила происходит снижение чрезмерной активности клеток системы мононуклеарных фагоцитов, фибробластов, что вносит свой вклад в предотвращение избыточного образования соединительной ткани. Использование полученных данных о фармакодинамике классических представителей БМКК может служить основанием для расширения представлений о возможных областях использования этих лекарственных средств, а также о новых точках приложения их эффектов в отношении функционально активных клеток разной локализации и тканевой принадлежности.

Выводы

1. Верапамил и дилтиазем моделирует функциональную активность фибробластов и клеток микроокружения – мононуклеарных фагоцитов, снижая их чрезмерную активность на стадии формирования спаек при гемоперитонеуме путем регуляторного воздействия на митотическую активность перитонеальных фибробластов и макрофагальную трансформацию моноцитов. Нормализующий эффект верапамила на фибробласты составил 1,8 раза, на макрофаги – в 1,3 раза выше, чем у дилтиазема. Нифедипин не оказывал антипролиферативного действия на клетки.

2. Верапамил через блокаду медленных кальциевых каналов обеспечивает ограничение избыточной продукции провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 на этапе пролиферации и

завершения процесса воспаления при гемоперитонеуме. Фармакологический эффект дилтиазема по ограничению избыточной продукции TNF- α , IL-1 был соответственно в 1,5 и 2 раза менее выражен по сравнению с верапамилем. Нифедипин статистически значимо не изменял уровень цитокинов.

3. Полученные данные о выраженном нормализующем действии верапамила в отношении чрезмерной активности фибробластов и макрофагов в культуре перитонеальных клеток крыс с гемоперитонеумом являются патогенетическим обоснованием для дальнейшего исследования верапамила в качестве средства предупреждения спаечного процесса в брюшной полости.

Список литературы

1. Демченко Т.А. Определение феномена макрофагальной трансформации мононуклеарных клеток в культуре лейкоцитов крови для оценки иммунологического состояния организма // Методические рекомендации. - Л.: Ленуприздат. 1980. 14 с.
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. - СПб: Фолиант. 2008. 549 с.
3. Пигарева Н.В., Королькова Т.Н., Симбирцев А.С. и др. Уровень цитокинов у пациентов с рубцами после акне // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. 2011. № 3. С. 3-6.
4. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1. Физиология. Патология. Клиника. - СПб: Фолиант. 2011. 480 с.
5. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // Медицинский академический журнал. 2013. № 3. С. 18-41.
6. Харкевич Д.А. Фармакология. - М.: ГЭОТАР-Медиа. 2010. 908 с.
7. Филленко Б.П., Земляной В.П., Борсак И.И., Иванов А.С. Спаечная болезнь: профилактика и лечение. - СПб. 2013. 171 с.
8. Boggio R.F., Freitas V.M., Cassiola F.M., Urabayashi M., Machado-Santelli G.M. Effect of a calcium-channel blocker (verapamil) on the

- morphology, cytoskeleton and collagenase activity of human skin fibroblasts // Burns. 2011. No. 37 (4). P. 616-25.
9. **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. Vol. 20. P. 2466-71.
10. **Luke J.J., Subhendu M., Kjetil A. Janssen** calcium homeostasis and ionic mechanisms in pulmonary fibroblasts // Am J. of respiratory cell and molecular biology. 2015. Vol. 53. No. 2. P. 135-148.
11. **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. No. 24(1). P. 293-821.
12. **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.

The impact of calcium channel blocking agents on peritoneal cells in simulation of adhesion formation in the abdominal cavity

S.V. Skalsky, T.F. Sokolova, D.A. Sychev

It has been studied the impact of CCBA, the derivatives of phenylalkilamin (verapamil), benzothiazepine (diltiazem), dihydropyridine (nifedipine), on the function of fibroblasts and macrophages in cell culture in simulated adhesion formation. It was found that verapamil and diltiazem reduced the excessive activity of fibroblasts and mononuclear phagocytes at the stage of adhesion formation in hemoperitoneum by regulation of mitotic activity of peritoneal fibroblasts and macrophagial monocyte transformation and restriction of excessive production of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1. Verapamil was the most effective drug. Fibroblast mitotic activity was reduced by 1.8 times; and macrophage monocyte transformation was lower by 1.3 times, restricted by the excessive production of TNF- α , IL-1 in 1.5 and 2 times, respectively, that was considerably higher than in diltiazem application. No similar effect in nifedipine prescription. The results obtained are the pathogenetic rationale for further study of verapamil as a drug for prevention of adhesion development and recurrence in the abdominal cavity in clinics.

Key words: verapamil, diltiazem, nifedipine, fibroblasts, macrophages.