© Коллектив авторов, 2019

УДК 615.035.1

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14016>

ISSN – 2073-8137

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРОВ МЕДЛЕННЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ НА ПРОЦЕССЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И КОЛЛАГЕНОГЕНЕЗА ФИБРОБЛАСТОВ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ СПАЕК В БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ

Л. М. Кузякова¹, С. В. Скальский², Э. Ф. Степанова³, М. А. Огай³,
Т. Н. Глижова¹, Т. Ф. Соколова², А. В. Локарев⁴, Е. В. Ковтун³

¹ Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

² Омский государственный медицинский университет, Россия

³ Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Волгоградского государственного медицинского университета, Россия

⁴ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Московская область, Россия

INFLUENCE OF BLOCKERS OF SLOW CALCIUM CHANNELS ON THE PROCESSES OF PROLIFERATION AND COLLAGENOGENESIS OF FIBROBLASTS IN THE FORMATION OF SPICES IN THE ABDOMINAL CAVITY

Kuzyakova L. M.¹, Skalskiy S. V.², Stepanova E. F.³, Ogay M. A.³,
Glizhova T. N.¹, Sokolova T. F.², Lokarev A. V.⁴, Kovtun E. V.³

¹ North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

² Omsk State Medical University, Russia

³ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of Volgograd State Medical University, Russia

⁴ Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry, Moscow region, Russia

Моделирование гемоперитонеума на этапе образования спаек сопровождается повышением пролиферации фибробластов: увеличением митотического индекса в 5 раз, уровня маркера пролиферации Ki-67 в 8 раз, 4-кратным увеличением образования белковосвязанного оксипролина. Верапамил и дилтиазем снижают чрезмерную активность фибробластов на стадии формирования спаек путем регуляторного воздействия на их пролиферативную и коллагенсинтетическую функции, уменьшая число митозов на 58,5 %, количество Ki-67⁺ клеток на 59,2 %, избыточную продукцию оксипролина на 66,7 %. Нормализующий эффект верапамила на фибробласты в 1,8 раза выше, чем у дилтиазема. Нифедипин антипролиферативное действие на клетки не оказывает.

Ключевые слова: хронические фибропролиферативные заболевания, послеоперационные спайки, рубцы, фибробласты, внеклеточный матрикс

Based on the results of the studies, it was found that the modeling of hemoperitoneum at the adhesion stage is accompanied by an increase in the proliferation of fibroblasts: an increase in the mitotic index by a factor of 5, the level of the Ki-67 proliferation marker by a factor of 8, and the enhancement of their collagen-synthetic function: a 4-fold increase in the formation of protein-bound oxyproline. Verapamil and diltiazem reduce the excessive activity of fibroblasts at the stage of formation of adhesions by regulating their proliferative and collagen-synthetic functions, reducing the number of mitoses by 58.5 %, the number of Ki-67⁺ cells by 59.2 %, the excess production of oxyproline by 66.7 %. The normalizing effect of verapamil on fibroblasts is 1.8 times higher than that of diltiazem. Nifedipine has no antiproliferative effect on cells.

Keywords: chronic fibroproliferative diseases, postoperative adhesions, scars, fibroblasts, extracellular matrix

Для цитирования: Кузякова Л. М., Скальский С. В., Степанова Э. Ф., Огай М. А., Глижова Т. Н., Соколова Т. Ф., Локарев А. В., Ковтун Е. В. ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРОВ МЕДЛЕННЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ НА ПРОЦЕССЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И КОЛЛАГЕНОГЕНЕЗА ФИБРОБЛАСТОВ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ СПАЕК В БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019;14(1.2):208-211. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14016>

For citation: Kuzyakova L. M., Skalskiy S. V., Stepanova E. F., Ogay M. A., Glizhova T. N., Sokolova T. F., Lokarev A. V., Kovtun E. V. INFLUENCE OF BLOCKERS OF SLOW CALCIUM CHANNELS ON THE PROCESSES OF PROLIFERATION AND COLLAGENOGENESIS OF FIBROBLASTS IN THE FORMATION OF SPICES IN THE ABDOMINAL CAVITY. *Medical News of North Caucasus*. 2019;14(1.2):208-211. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14016> (In Russ.)

Проблема избыточного образования соединительной ткани актуальна в различных областях медицины. Осложнения хронических фибропролиферативных заболеваний обеспечивают существенный прирост смертности и ухудшения качества жизни пациентов. Среди последних факторов выделяются послеоперационные спайки [1].

В общехирургической, гинекологической практике спаечные процессы развиваются не менее, чем в 50 % случаев. Проблеме повышения качества лечения больных с перитонеальными спайками посвящены многочисленные работы отечественных и зарубежных авторов [2, 3, 4]. Вместе с тем современные достижения фармакологии и разнообразие способов профилактики и лечения спайко- и рубцовообразования не позволяют считать данную проблему решенной [5]. Одним из перспективных направлений решения проблемы является использование фармакологических средств, обладающих воздействием на ключевые патогенетические звенья процессов спайкообразования на клеточном и молекулярном уровнях. Известно, что основой фиброгенеза являются фибробласты, которые при активации синтезируют большое количество внеклеточного матрикса. Учитывая, что большинство клеточных энергетических и пластических событий опосредуются кальцием, можно предположить, что антагонисты кальция – БМКК, которые тормозят или полностью блокируют вход ионов кальция внутрь клеток, могут быть инструментом воздействия на фибробласты, тем самым вмешиваясь в образование заместительной соединительной ткани.

Все изложенное выше явилось основанием к изучению действия БМКК на формирование соединительной ткани при спайкообразовании, а также возможности использования вновь выявленных свойств у БМКК.

Цель исследования – оценка влияния БМКК – верапамила, дилтиазема, нифедипина на регуляторные процессы пролиферации и коллагеногенеза в культуре фибробластов крыс, активированных *in vivo* при моделировании гемоперитонеума.

Материал и методы. Исследования проведены в первичной культуре перитонеальных фибробластов, полученных от 82 беспородных белых крыс с массой тела 220–230 г. Моделировали спаечный процесс введением в брюшную полость крыс аутокрови. На 10 сутки моделирования спаечного процесса сразу после эвтаназии путем декапитации наркотизированных диэтиловым эфиром животных брюшную полость дважды промывали 10 мл среды RPMI-1640 («Sigma»), содержащей 250 Ед гепарина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 ЕД/мл стрептомицина, подсчитывали количество спаек. Перитонеальные смывы центрифугировали при 800 об/мин 10 минут. Клетки трижды отмывали средой RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 % глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина. Клеточные суспензии, содержащие 90–95 % живых клеток, эксплантировали в чашки Петри (D=40 мм), обработанные поли-D-лизином, в 5 мл полной ростовой среды вышеуказанного состава по 2×10^6 ядродержащих клеток на 1 мл среды. Клеточные культуры активированных фибробластов, полученные от животных с гемоперитонеумом, были разделены на 4 пула клеток: 1 – культура фибробластов без добавления в ростовую среду лекарственных средств (контроль), 2 – с введением в клеточную культуру 0,25 % раствора верапамила (ОАО «Биосинтез», Россия), 3 – раствора дилтиазема («Nospira»), 4 – раствора нифедипина («Bayerg», Германия). Использовали

2 уровня доз: 0,05 и 0,1 мг/мл. Чашки помещали в CO₂-инкубатор (Revco, США) на 24 часа (t 37 °C, 5 % CO₂). Кроме того, получали культуру клеток у интактных животных – 5 группа сравнения. Работу с клеточными культурами проводили с соблюдением правил асептики и антисептики в стерильном боксе, оборудованном ламинарным шкафом 2 класса биологической безопасности (Labconco, США).

Пролиферативную активность фибробластов в гистологическом исследовании с окраской по Романовскому – Гимзе оценивали по количеству клеток с морфологическими признаками митозов на бинокулярном световом микроскопе (Axioscop «Carl Zeiss», Германия), а также путем определения в ядрах фибробластов маркера пролиферации – белка Ki-67, экспрессирующегося на всех стадиях клеточного цикла, кроме стадии G₀. Подсчитывали количество клеток с морфологическими признаками митозов среди 400 просмотренных фибробластов. Митотический индекс (МИ) определяли по формуле

$$MI = n/N \times 100 \%,$$

где n – число клеток, вступивших в митоз, N – общее количество клеток. Иммуноцитохимическое исследование негистонового протеина Ki-67 фибробластов выполняли по стандартной методике с использованием в качестве первичных антител МКА к Ki-67 («Sigma», США) в разведении 1:20 и вторичных ФИТС-меченых козьих антител к иммуноглобулинам мыши («Сорбент», Россия). В качестве контроля для исключения прямого иммуномечения (окрашивания) клеток вторичными антителами вместо первичных антител использовали фосфатно-солевой буфер (PBS). Полученные препараты изучали с помощью люминесцентного микроскопа (AxioPhot, «Carl Zeiss», Германия), применяя объективы x100/1,3 и окуляр x10 с подсчетом клеток, имеющих светящиеся фокусы в области ядра, и предварительной оценкой клеток при фазово-контрастной микроскопии. Степень стимуляции коллагеногенеза оценивали по количеству белковосвязанного оксипролина, определяемого в супернатантах клеточных культур по разности содержания свободного и суммарного оксипролина.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов «Statistica 6,0 for Windows», биостатистика (StatSoft, Inc.США) и MS Excel в среде Windows. Вид распределения тестировали критерием Шапиро – Уилка. Достоверность различий при парном сравнении величин выявляли по критерию Стьюдента. Корреляционный анализ проводили по Спирмену. Средние выборочные значения количественных признаков приведены в виде M – среднее выборочное, m – стандартная ошибка среднего. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение. Установлено, что у крыс с гемоперитонеумом пролиферативная активность фибробластов была высокой: митотический индекс превышал показатели контроля более чем в 5 раз, уровень маркера пролиферации Ki-67 был повышен почти в 8 раз. Выявлено 4-кратное увеличение коллагенсинтетической функции активированных фибробластов. Отмечена прямая корреляционная связь между пролиферативной активностью фибробластов, количеством белковосвязанного оксипролина и числом спаек в брюшной полости крыс ($r=0,91$, $r=0,78$; $p<0,05$). Верапамил и дилтиазем снижали чрезмерную активность фибробластов на стадии формирования спаек путем регуляторного воздействия на их пролиферативную и коллагенсинтетическую функции, уменьшая число митозов на 58,5 %, количество

Ki-67⁺ клеток – на 59,2 %, избыточную продукцию оксипролина – на 66,7 %. Нормализующий эффект верапамила на фибробласты в 1,8 раза был выше, чем у дилтиазема. Нифедипин антипролиферативное действие на клетки не оказывал.

В культуре клеток, полученной от интактных крыс (5 группа – сравнения), пролиферативная активность фибробластов через 24 часа культивирования была низкой. Митотический индекс составил менее 2,5 %. Экспрессия маркера пролиферации белка Ki-67 в ядрах интактных фибробластов здоровых животных не превышала 4 % (табл.). У животных 1 группы на 10 сутки после развития гемоперитонеума митотический индекс в суточной культуре фибробластов превысил показатели группы сравнения в 5,3 раза, антиген Ki-67 маркировал почти в 8 раз большее количество клеток. Усиление процессов пролиферации в культуре активированных *in vivo* перитонеальных фибробластов крыс

на 10 сутки асептического воспаления брюшины сочеталось с образованием в брюшной полости соединительнотканых спаек со средним количеством 8,2±1,8 на одно животное. Выявлено наличие тесной положительной связи ($r=0,91$; $p<0,05$) между показателем пролиферации фибробластов и числом соединительнотканых спаек в брюшной полости крыс. Оценка основной коллагенсинтетической функции фибробластов по количеству маркера коллагена белковосвязанного оксипролина показала, что при моделировании гемоперитонеума в культуре активированных *in vivo* фибробластов наблюдалось 4-кратное увеличение количества оксипролина в сравнении с показателями в культуре неактивированных фибробластов ($p<0,05$). Отмечена прямая корреляционная связь между количеством белковосвязанного оксипролина и числом спаек в брюшной полости крыс с гемоперитонеумом ($r=0,78$; $p<0,05$).

Таблица

Влияние БМКК на митотическую активность фибробластов, экспрессию в клетках антигена Ki-67, количество оксипролина у крыс при образовании спаек в брюшной полости (M±m)

Показатель	Концентрация препарата		Контроль	Группа сравнения
	0,05 мг/мл	0,1 мг/мл		
Верапамил				
МИ фибробластов, %	8,2±0,3*	5,1±0,1*^	12,3±0,4	2,3±0,2*
Количество Ki-67+ клеток, %	19,9±0,4*	13,3±0,6*^	32,6±0,7	3,7±0,3*
Оксипролин, мкмоль/л	12,6±0,9*	8,9±0,2*^	26,7±1,7	6,5±0,4*
Дилтиазем				
МИ фибробластов, %	11,7±0,4	9,4±0,3*^	12,3±0,4	2,3±0,2*
Количество Ki-67+ клеток, %	27,2±0,9*	17,5±0,5*^	32,6±0,7	3,7±0,3*
Оксипролин, мкмоль/л	18,9±1,2*	14,3±1,1*^	26,7±1,7	6,5±0,4*
Нифедипин				
МИ фибробластов, %	12,4±0,5	11,5±0,3	12,3±0,4	2,3±0,2*
Количество Ki-67+ клеток, %	31,9±1,3	30,1±1,9	32,6±0,7	3,7±0,3*
Оксипролин, мкмоль/л	25,9±2,9	23,1±0,5	26,7±1,7	6,5±0,4*

Примечание: * – $p<0,05$ между 2–5 группами и контролем; ^ – $p<0,05$ между концентрациями лекарственных средств.

Введение верапамила в культуру клеток в концентрациях 0,05 и 0,1 мг/мл обеспечивало достоверное снижение активности фибробластов: митотическая активность клеток снизилась на 33,3 и 58,5 %, составляя 66,7 и 41,5 % соответственно от уровня активированных культур без лекарственного средства. Количество Ki-67⁺ клеток, экспрессирующих маркер пролиферации, составило 61,0 и 40,8 % соответственно от уровня активированных культур без верапамила. В культуре перитонеальных клеток препарат уменьшал гиперпродукцию коллагена активированными фибробластами. Количество белковосвязанного оксипролина, синтезируемого фибробластами в культуральной жидкости с верапамилем, было на 66,7 % ниже, чем в культуре клеток без добавления лекарственного средства. Степень снижения уровня данного вещества была более значима при концентрации препарата 0,1 мг/мл.

Дилтиазем (0,05 и 0,1 мг/кг) также обеспечивал снижение функциональной активности клеток соединительной ткани, но его влияние оценено как менее выраженное, чем у верапамила. Влияние дилтиазема коррелировало с его концентрацией. Добавление к культуральной среде 0,1 мг/мл препарата приводило к статистически значимому в сравнении с контролем снижению уровней митозов фибробластов, количества Ki-67⁺ клеток, оксипролина. При меньшей концентрации дилтиазема (0,05 мг/мл) достоверные различия с контролем выявлены для Ki-67⁺ клеток и оксипролина ($p<0,05$). Нифедипин в исследуемых

концентрациях не оказывал действия на культуру активированных фибробластов, не влиял на количество синтезируемого оксипролина.

Закключение. Моделирование гемоперитонеума на этапе образования спаек сопровождается повышением пролиферации фибробластов: увеличением митотического индекса в 5 раз, уровня маркера пролиферации Ki-67 в 8 раз, усилением их коллагенсинтетической функции: 4-кратным увеличением образования белковосвязанного оксипролина. Верапамил и дилтиазем снижают чрезмерную активность фибробластов на стадии формирования спаек путем регуляторного воздействия на их пролиферативную и коллагенсинтетическую функции, уменьшая число митозов на 58,5 %, количество Ki-67⁺ клеток – на 59,2 %, избыточную продукцию оксипролина – на 66,7 %. Нормализующий эффект верапамила на фибробласты в 1,8 раза выше, чем у дилтиазема. Нифедипин антипролиферативное действие на клетки не оказывает.

Информированное согласие: Опыты проводили при строгом соблюдении требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и приказов МЗ СССР № 755 от 12.08.77 и № 701 от 27.07.78 об обеспечении принципов гуманного обращения с экспериментальными животными, после одобрения протокола исследования локальным этическим комитетом.

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Zhang Y., Zhao X., Chang Y., Zhang Y., Chu X. [et al.]. Calcium channel blockers ameliorate iron overload-associated hepatic fibrosis by altering iron transport and stellate cell apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2016;301:50-60. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.04.008>
2. Алексеев А. А., Сулима А. Н. Современные представления об этиологии и патогенезе спаечного процесса в малом тазу у женщин репродуктивного возраста. *Медицинский вестник Юга России*. 2016;(1):4-14. [Alekseev A. A., Sulima A. N. Sovremennyye predstavleniya ob etiologii i patogeneze spaychnogo protsessa v malom tazu u zhenshchin reproduktivnogo vozrasta. *Meditsinskii Vestnik Yuga Rossii*. – *Medical Bulletin of the South Russia*. 2016;(1):4-14. (In Russ.)].
3. Alkhamesi N. A., Schlachta C. M. The role of aerosolized intraperitoneal heparin and hyaluronic acid in the prevention of postoperative abdominal adhesions. *Surgical Endoscopy*. 2013;27(12):4663-4669. <https://doi.org/10.1007/s00464-013-3102-5>
4. Fortin C. N., Saed G. M., Diamond MP. Predisposing factors to post-operative adhesion development. *Human Reproduction Update*. 2015;21(4):536-551. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv021>
5. Roman H., Bourdel N., Canis M., Rigaud J., Delavierre D. [et al.]. Adhesions and chronic pelvic pain. *Progrès en Urologie*. 2010;20(12):1003-9. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2010.08.003>

Сведения об авторах:

Кузякова Людмила Михайловна, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармации Института живых систем; тел.: 89624420068; e-mail: kuzjakova@inbox.ru

Скальский Сергей Викторович, кандидат медицинских наук, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии; тел.: 89136012211; e-mail: sergalskiy@mail.ru

Степанова Элеонора Федоровна, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии; тел.: 89289198335; e-mail: efstepanova@yandex.ru

Огай Марина Алексеевна, доктор фармацевтических наук, профессор; тел.: 89881163575; e-mail: marinfarm@yandex.ru

Глижова Тамара Николаевна, кандидат фармацевтических наук, и.о. заведующего кафедрой фармации, доцент кафедры фармации Института живых систем; тел.: 89624381570; e-mail: glizhova68@mail.ru

Соколова Татьяна Федоровна, доктор медицинских наук, ассистент кафедры фармакологии, клинической фармакологии; тел.: 89136510251; e-mail: tfsokolova@mail.ru

Локарев Александр Владимирович, кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник; тел.: 89688265026; e-mail: eko-plus@mail.ru

Ковтун Елена Владимировна, кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии; тел.: 89624425246; e-mail: elena.f.73@mail.ru

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-008.9-092.4+615.03+616.8

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14017>

ISSN – 2073-8137

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

А. С. Кучеренко¹, В. И. Петренко¹, А. В. Кубышкин¹, И. И. Фомочкина¹,
Л. Е. Сорокина¹, В. В. Ткач¹, Ю. А. Огай², Ю. И. Шрамко¹

¹ Медицинская академия им. С. И. Георгиевского Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского, Симферополь, Россия

² Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия РАН, Ялта, Россия

RESEARCH OF MECHANISMS OF NEURODEGENERATIVE PROCESSES IN EXPERIMENTAL METABOLIC SYNDROME

Kucherenko A. S.¹, Petrenko V. I.¹, Kubyshkin A. V.¹, Fomochkina I. I.¹,
Sorokina L. E.¹, Tkach V. V.¹, Ogay Yu. A.², Shramko Yu. I.¹

¹ Medical Academy named after S. I. Georgievsky of V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

² Federal State Institution of Science «Russian National Research Institute Viticulture and Winemaking «RAS», Yalta, Russia

На 82 белых крысах линии Wistar получены данные о связи воспалительных изменений в крови и ткани головного мозга крыс с уровнем экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF), распределением нейрональной NO-синтазы (nNOS) в головном мозге и степенью когнитивных расстройств у крыс при экспериментальном метаболическом синдроме (МС). Выявлено морфологическое подтверждение развития нейродегенеративных процессов