

Скальский Сергей Викторович

**БЛОКАТОРЫ МЕДЛЕННЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ:
НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ РЕГУЛЯТОРОВ
ОБРАЗОВАНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ**

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Москва – 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант -
доктор медицинских наук, профессор

Зырянов Сергей Кенсаринovich

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Духанин Александр Сергеевич**, ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, профессор кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В. Сергеева;

доктор медицинских наук, профессор **Раков Андрей Александрович**, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, заведующий кафедрой фармакологии;

доктор медицинских наук, профессор **Яворский Александр Николаевич**, ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт» Минобрнауки России, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной биомедицины.

Ведущая организация: научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».

Защита диссертации состоится «25» октября 2018 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.18 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (117292, Москва, ул. Вавилова, д. 61, ГБУЗ «ГКБ им. В.В. Виноградова ДЗМ»).

С диссертацией можно ознакомиться в УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6) и на сайте <http://www.rudn.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.203.18
доктор медицинских наук, профессор

Киякбаев Г. К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Проблема избыточного образования соединительной ткани в медицине затрагивает фактически все сферы: актуальна в клинике внутренних болезней, хирургии, комбустиологии, косметологии, офтальмологии. Почти 45% всех случаев смерти в развитых странах мира приходится на хронические фибропролиферативные заболевания (Wynn T.A. с соавт., 2012). Частным случаем фибропролиферативных состояний являются послеоперационные спайки и гипертрофические/келоидные рубцы (Awonuga A. O. с соавт., 2011; Zeisberg M. с соавт., 2013). Спайки развиваются у 50-100% больных после общехирургических абдоминальных операций и у 70-97% пациенток после гинекологических оперативных вмешательств (Аникин С.С. с соавт., 2012; Дронов А.И. с соавт., 2015; Ward B.C. с соавт., 2011). Особое место среди потенциальных последствий спайкообразования занимают абдоминальная и тазовая боли, кишечная непроходимость, сложность повторных хирургических вмешательств и интраперитонеальной химиотерапии, у женщин бесплодие, повышенный риск внематочной беременности. Распространенность гипертрофических/келоидных рубцов после ожогов составляет около 67% (Nguyen T. A. с соавт., 2015). Чрезмерное рубцевание является ведущей причиной снижения качества жизни обожженных. Ожоговые больные часто требуют длительного периода реабилитации. Значительная часть восстановительной фазы относится к функциональным и косметическим ограничениям, накладываемым гипертрофическими и келоидными рубцами, включающим сокращение диапазона движения конечностей, интенсивный кожный зуд и непереносимость высокой или низкой температур, нарушения физической и социальной активности пациентов (Al-Shaqsi S. с соавт., 2016).

Степень разработанности темы исследования

Проблеме повышения качества лечения больных с перитонеальными спайками и с гипертрофическими и келоидными кожными рубцами посвящены многочисленные современные работы отечественных и зарубежных авторов (Адамян А. В., 2013; Анойко Е. А., 2016; Батюнин В. А., 2009; Ермолов А. С. с соавт., 2008; Randall D. с соавт., 2016; Mettler L. с соавт., 2008; Alkhamesi N. A. с соавт., 2013; Fortin C. N. с соавт., 2015; Uysal B. с соавт., 2012) Однако, несмотря на современные достижения и разнообразие способов профилактики и

лечения спайко- и рубцовообразования, результаты их нельзя признать удовлетворительными (Бойко В. В. с соавт., 2013; Weisthal S. с соавт., 2014). Одним из перспективных направлений решения проблемы является использование фармакологических средств, обладающих воздействием на ключевые патогенетические звенья процессов спайко- и рубцовообразования на клеточном и молекулярном уровнях. Однако патогенез спаек и келоидных рубцов до сих пор недостаточно изучен (Butler P.D. с соавт., 2008), отсутствуют адекватные методики моделирования спаек и как следствие - не существует терапии, эффективно препятствующей избыточному фиброгенезу. Возможности антифибротической терапии определяются современными знаниями о клеточно-молекулярных механизмах фиброгенеза. Известно, что основой фиброгенеза являются фибробласты, синтезирующие при активации большое количество внеклеточного матрикса (Mettler L. с соавт., 2008; Parker M. W. с соавт., 2014; Weber K. T. с соавт., 2015). Важно отметить, что фиброгенез продолжается до тех пор, пока эти клетки сохраняются в ране; их удаление путем апоптоза является частью перехода между грануляционной тканью и заживлением с образованием физиологических рубцов (Barnes P. J., 2014). Задержка и отсутствие индукции апоптоза фибробластов приводят к чрезмерному фиброгенезу (Ikeda K. с соавт., 2013; Duffield J. S. с соавт., 2013). Одним из главных факторов, регулирующих процессы апоптоза, является ядерный транскрипционный фактор NF-κB. Активация NF-κB приводит к блокированию процессов апоптоза, продлевая жизнь клеток-эффекторов в очаге воспаления (Lee Y. S. с соавт., 2015). Моноциты, макрофаги и дендритные клетки также оказывают влияние на воспаление и фиброз. Эти клетки регулируют активацию фибробластов и их предшественников через цитокин-зависимые и -независимые пути, в том числе и через влияние на ядерный фактор транскрипции NF-κB, вызывая дополнительное повреждение тканей и стимулируя антиапоптотические свойства фибробластов (Fernandez I. E. с соавт., 2012; Fernandez I. E. с соавт., 2012; Lee Y. S. с соавт., 2015). Ключевым вторичным мессенджером, опосредующим большинство клеточных событий и принимающим активное участие в регуляции основной функции фибробластов – строительстве соединительной ткани, является ионизированный кальций (Ca^{2+}) (Бозо И. Я. с соавт., 2010; Chen J. В. с соавт., 2010). Нарушения Ca^{2+} -гомеостаза фибробластов сопровождаются изменением жизнеспособности клеток, процессов пролиферации, синтеза белка, активацией факторов транскрипции (Gryshchenko O. с соавт., 2016; Weisthal S. с соавт., 2014). Напротив, многие факторы роста и цитокины изменяют содержание Ca^{2+} в фибробластах (Shlyonsky V. с соавт., 2011). Некоторые ферменты способны трансформировать информацию, закодированную в частоте Ca^{2+} колебаний (Kaneko Y. с соавт., 2014; Smedler E. с соавт., 2014). Это приводит к активации факторов транскрипции с последующей регуляцией транскрипции генов (Hwang Y. P. с соавт., 2011;

Jimenez S. A., 2013; Zamponi G. W. с соавт., 2015; Zamponi G. W., 2015). Важная роль Ca^{2+} -гомеостаза в регуляции протеостаза, транскрипции генов и клеточных процессов, связанных с дифференцировкой, пролиферацией и гибелью клеток, участвующих в фиброгенезе (Gryshchenko O. с соавт., 2016; Weisthal S. с соавт., 2014), указывают на то, что антагонисты кальция (блокаторы медленных кальциевых каналов - БМКК), которые тормозят или полностью блокируют вход ионов кальция внутрь клеток по потенциалзависимым кальциевым каналам, могут быть инструментом воздействия на фибробласты и клетки их микроокружения при избыточном образовании заместительной соединительной ткани. Однако использование БМКК в клинической практике ограничивается их кардиогемодинамическими эффектами, нивелирующими их антифиброгенное действие.

В последние годы в зарубежной литературе появился ряд сообщений, прямо или косвенно свидетельствующих о наличии у БМКК фармакологических эффектов, реализуемых модификацией формирующейся соединительной ткани с подавлением формирования атеросклеротического поражения (Ishii N. с соавт., 2012; Hayashi T. с соавт., 2014; Liang S. J. с соавт., 2016; Cosa A. с соавт., 2013), снижением коллаген-продуцирующей функции легочных фибробластов (Janssen L. J. с соавт., 2015), наличием антифиброгенного эффекта при фиброзе печени (Zhang Y. с соавт., 2016) и болезни Пейрони (Alizadeh M. с соавт., 2014; Dell'Atti L., 2015), при контрактуре Дюпюитрена (Malta M. C. с соавт., 2013; Zidel P., 2012), уменьшением образования послеоперационных эпидуральных и внутрисуставных спаек (Li M. C соавт., 2016). Появились данные локального применения БМКК верапамила в клинике для лечения гипертрофических и келоидных рубцов (Boggio R. F. с соавт., 2014; Danielsen P. L., 2016) при инъекционном введении препарата в ткани рубца. Существенным недостатком методики считают выраженную болезненность процедуры. Исследования новых свойств известных, зарекомендовавших себя в медицинской (кардиологической) практике БМКК, носят скорее констатирующий характер, то есть документируют эффективность БМКК в предотвращении чрезмерного фиброгенеза, но при этом не содержат сколько-нибудь аргументированного толкования механизмов их действия. Следует учитывать, что БМКК - большая и достаточно неоднородная по химической структуре группа лекарственных средств, включающая высокоспецифичные в отношении медленных кальциевых каналов (производные фенилалкиламина, бензотиазепина, дигидропиридина) и неспецифичные (производные прениламина, дифенилпиперазины) препараты, существенно различающиеся по фармакокинетическим параметрам и фармакодинамическим свойствам. Вероятно, БМКК разных химических групп обладают разной активностью в отношении регуляции формирования соединительной ткани. Данные о влиянии разных БМКК на процессы фиброгенеза при спайко-

и рубцовообразовании немногочисленны, противоречивы и требуют дальнейших исследований (Ishii N., 2012; Kawamura A. с соавт., 2014; Ohya S. с соавт., 2016).

Все выше изложенное явилось основанием для проведения исследований действия БМКК на формирование соединительной ткани при спайко- и рубцовообразовании (от создания адекватной экспериментальной модели патологического процесса до выявления механизмов действия БМКК на молекулярном, клеточном, органном и организменном уровнях, с определением наиболее эффективного препарата, дозового режима и способов его введения), а также возможности использования вновь выявленных свойств лекарственных средств группы БМКК для более рационального их применения, создания новых лекарственных форм.

Цель исследования

Выявить закономерности и особенности фармакодинамики блокаторов медленных кальциевых каналов в качестве регуляторов образования соединительной ткани при спаечном процессе в брюшной полости и формировании патологических кожных рубцов. Разработать оптимальный состав и технологию оригинального антирубцового крема с верапамилом, обосновать его эффективность и безопасность.

Задачи исследования

1. Для проведения фармакодинамических исследований на крысах и кроликах создать модель перитонеального спайкообразования, провести мониторинг спаечного процесса и разрастания соединительной ткани в брюшной полости с определением функциональной активности фибробластов и макрофагов.
2. Изучить дозозависимое влияние БМКК нифедипина, дилтиазема и верапамила на пролиферативную и анаболическую активность перитонеальных фибробластов и макрофагов крыс с использованием клеточных технологий.
3. Исследовать экспрессию транскрипционного фактора NF-κB в перитонеальных и дермальных фибробластах и влияние БМКК нифедипина, дилтиазема и верапамила на молекулярные механизмы регуляции активности разных типов фибробластов.
4. Среди исследуемых БМКК определить наиболее эффективный препарат для предотвращения избыточного фиброгенеза; обосновать дозовый режим его внутрибрюшинного введения крысам, оптимальный для профилактики образования спаек при минимальной выраженности или отсутствии кардио- и гемодинамических эффектов
5. Изучить влияние верапамила на распространенность спаечного процесса в брюшной полости крыс и кроликов, морфологические характеристики спаек, биохимические показатели и цитокиновый профиль перитонеальной жидкости.

6. Разработать новую лекарственную форму – антирубцовый крем с верапамилом, обосновать выбор компонентов для противорубцовой композиции, провести технологические исследования по разработке оптимального состава крема.

7. Экспериментально обосновать эффективность и безопасность применение антирубцового крема с верапамилом для профилактики и лечения патологических кожных рубцов.

Научная новизна

Впервые с использованием комплексного и разноуровневого (молекулярный, клеточный и организменный уровень) подхода на адекватной экспериментальной модели образования спаек в брюшной полости (патент 2260854 РФ) *in vivo* (крысы, кролики) и *in vitro* (первичная культура перитонеальных фибробластов крыс с гемоперитонеумом и перевиваемой культуре дермальных фибробластов человека, производства Axol Bioscience), а также на модели формирования патологических рубцов кожи доказано наличие у широко используемых в кардиологии лекарственных средств БМКК способности регулировать избыточное образование соединительной ткани при перитонеальном спайкообразовании и посттравматическом формировании келоидных и гипертрофических кожных рубцов.

Показано, что моделирование гемоперитонеума приводит к образованию в брюшной полости экспериментальных животных множественных соединительнотканых спаек и вызывает как *in vitro*, так и *in vivo* повышение (в среднем 6 – 10-кратное) пролиферативной активности фибробластов, их коллагенсинтетической функции, продукции гиалуроновой кислоты, усиливает функциональную активность макрофагов, увеличивая темпы их трансформации из моноцитов, синтез провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1.

Изучение *in vitro* на первичных культурах перитонеальных фибробластов крыс позволило установить факт прямого воздействия БМКК верапамила и дилтиазема на морфофункциональное состояние фибробластов и макрофагов. Показано, что в основе предотвращения избыточного роста соединительной ткани верапамилом или дилтиаземом лежит снижение чрезмерной при гемоперитонеуме пролиферативной активности фибробластов и макрофагов, активности ядерного фактора транскрипции NF- κ B, приводящего к ингибированию процессов апоптоза, торможение продукции оксипролина и гиалуроновой кислоты, провоспалительных цитокинов. Выявлена дозовая зависимость установленного эффекта: наибольшей фармакологической активностью обладал верапамил в концентрации 0,0001 мг⁻¹. Нормализующий эффект верапамила оказался более значимым (в среднем на 35,5%, $p < 0,05$), чем у дилтиазема в той же концентрации. Нифедипин фармакологической активности в отношении перитонеальных фибробластов и макрофагов не демонстрировал.

Впервые установлено, что независимо от типа культивируемых клеток (перитонеальные фибробласты крыс или дермальные фибробласты человека) под действием БМКК происходят однотипные изменения молекулярных механизмов их активации – ингибирование ядерного фактора транскрипции NF-κB. Наличие у верапамила угнетающего влияния на NF-κB объясняет универсальность его антипролиферативного действия в отношении фибробластов в составе соединительнотканых образований различной локализации.

In vivo, в экспериментах по изучению фармакодинамики верапамила, подтверждена доказанная in vitro эффективность лекарственной модуляции функций перитонеальных фибробластов и клеток их микроокружения. Установлена оптимальная доза (0,1 мг/ кг массы тела) верапамила для внутривнутрибрюшинного введения, оказывающая выраженный фармакологический эффект в отношении избыточной продукции соединительной ткани, пролиферативной и анаболической активности перитонеальных фибробластов и макрофагов и не вызывающая значимых изменений кардио- и гемодинамики.

Патогенетически обоснована целесообразность использования верапамила как средства профилактики и лечения спаечной болезни и гипертрофических и келоидных рубцов кожи. Доказанная оптимизация функций фибробластов и образования соединительной ткани под действием верапамила путем влияния на кальциевый обмен, а также универсальность действия БМКК на молекулярные механизмы регуляции перитонеальных и дермальных фибробластов обосновывают разработку лекарственной формы верапамила кожного применения для профилактики и лечения патологических кожных рубцов.

Разработан антирубцовый крем (патент 2290919 РФ), содержащий 0,25% раствор верапамила, ланолин и вазелин, димексид при определенном количественном соотношении компонентов, обоснованном теоретически и подтвержденном стендовыми испытаниями. На основании результатов технологических и биофармацевтических исследований был осуществлен выбор оптимальной концентрации верапамила и предпочтительной основы крема, проведена оценка антирубцового крема в качестве средства предупреждения избыточного фиброгенеза. При экспериментальном изучении динамики клинических, биомикроскопических и морфологических изменений в патологических рубцах кожи установлена эффективность крема, содержащего верапамил, при щадящем, безболезненном способе его применения. Клинический эффект проявлялся формированием физиологического рубца, уменьшением площади рубцовой поверхности, изменением цвета рубца, исчезновением болевых ощущений. Морфологическим и биомикроскопическим методами доказан факт более раннего структурного созревания рубца без гипертрофии. С использованием данного способа фармакологического

воздействия удалось контролировать процесс избыточного рубцевания, добиться оптимальных морфологических, функциональных и косметических результатов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа носит фундаментальный и прикладной характер. В результате проведенных исследований определены новые свойства широко используемых в кардиологии классических БМКК в отношении регуляции образования соединительной ткани, изучены их фармакодинамические характеристики, выявлен наиболее эффективный для регуляции избыточного фиброгенеза препарат – верапамил, что легло в основу создания новой лекарственной формы - антирубцового крема с оценкой эффективности его применения.

Для изучения механизмов формирования перитонеальных спаек и исследований лекарственных средств коррекции избыточного роста соединительной ткани создана адекватная универсальная модель спайкообразования на основе введения аутокрови в брюшную полость разных видов животных (патент 2260854 РФ).

В разработанной модели с помощью клеточных технологий определена фармакологическая эффективность действия различных групп БМКК: производных фенилалкиламина (верапамил), бензотиазепина (дилтиазем), дигидропиридина (нифедипин) на образование заместительной соединительной ткани путем регуляции функции основных клеток соединительной ткани - фибробластов и клеток их микроокружения.

Выявлено, что верапамил является наиболее эффективным препаратом для регуляции избыточного фиброгенеза с универсальным механизмом действия на разные типы фибробластов (перитонеальные фибробласты крысы и дермальные фибробласты человека). Обоснован дозовый режим (0,1 мг/ кг массы тела) внутривентрального введения верапамила, оптимальный для профилактики избыточного роста соединительной ткани при спайкообразовании с отсутствием кардио- и гемодинамических эффектов.

Разработана новая лекарственная форма верапамила для местного воздействия на формирующийся гипертрофический/келоидный рубец – антирубцовый крем (патент 2290919 РФ). В фармакологических экспериментах установлена эффективность крема, проявляющаяся уменьшением площади рубцовой поверхности, изменением цвета рубца, исчезновением болевых ощущений. Морфологически доказан факт более раннего структурного созревания рубца кожи без гипертрофии. Верапамил укорачивал все фазы воспаления, усиливал репаративные процессы, блокировал гипертрофию и приводил к преимущественному формированию физиологических рубцов.

Методология и методы исследования

Реализована методология изучения фармакодинамической активности БМКК в отношении соединительной ткани и ее основных клеток - фибробластов: от формулировки рабочей гипотезы через внедрение адекватной экспериментальной модели и проведение исследований *in vivo* и *in vitro*, до создания новой лекарственной формы антирубцового крема с верапамилом.

Всесторонние доклинические испытания новых свойств БМКК на живых системах проводились *in vivo* на целостном организме (447 животных - крысы, кролики) и *in vitro* на 720 первичных культурах перитонеальных фибробластов и макрофагов и на 160 перевиваемых культурах дермальных фибробластов человека (Human Dermal Fibroblasts (Adult) производства Axol Bioscience). Проведены фармакотехнологические исследования по разработке оптимального состава антирубцового крема с верапамилом.

Эксперименты выполнялись на 383 белых крысах самцах массой 200 – 240 граммов и 64 кроликах самцах породы Шиншилла массой 2500 – 3200 граммов при строгом соблюдении требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, выводу их из эксперимента и последующей утилизации. В постановке опытов руководствовались требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609. На первом этапе экспериментов разрабатывался способ моделирования внутрибрюшинных спаек (гемоперитонеум) у крыс и кроликов (патент 2260854 РФ).

На втором этапе проведено 6 серий экспериментов:

1-я серия - *in vivo* исследовали морфологические характеристики перитонеальных спаек, биохимический состав и цитокиновый профиль перитонеальной жидкости на 7, 10 сутки после моделирования гемоперитонеума у крыс;

2-я серия - *in vitro* тестировали БМКК: верапамил, дилтиазем и нифедипин в разных дозовых режимах на первичных культурах перитонеальных фибробластов крыс с гемоперитонеумом;

3-я серия - *in vivo*, после выявления в культуральном модуле препарата с наиболее выраженным фармакологическим эффектом (верапамил), оценили его действие на формирование соединительной ткани в целостном организме крыс, определили режим дозирования верапамила, исходя из необходимости минимизировать кардио- и гемодинамические эффекты препарата;

4-я серия - *in vivo*, для подтверждения универсальности разработанной модели спайкообразования и идентичности действия верапамила у разных видов животных, проведены

эксперименты на кроликах с оценкой морфо-функциональных характеристик процесса спайкообразования;

5 серия - *in vitro*, для выявления универсальности действия верапамила на разные типы фибробластов (перитонеальные фибробласты крысы и дермальные фибробласты человека) тестировали БМКК верапамил, дилтиазем и нифедипин на перевиваемой культуре дермальных фибробластов человека (Human Dermal Fibroblasts (Adult) производства Axol Bioscience). Полученный экспериментальный материал послужил основанием для создания новой лекарственной формы верапамила для местного воздействия на формирующийся гипертрофический/келоидный рубец – антирубцового крема, содержащего 0,25% раствор верапамила гидрохлорида, ланолин, вазелин, димексид (патент 2290919 РФ);

6-я серия - *in vivo*, для оценки эффективности оригинального антирубцового крема, после моделирования патологических рубцов кожи, на них дважды в день наносили крем с верапамилем и сравнивали с результатами аналогичного воздействия на рубцы основы крема без верапамила. Для подтверждения безопасности крема его втирали в неповрежденный участок кожи. Морфо-функциональные исследования проводили на 10, 30 и 60 сутки лечения.

Для решения поставленных цели и задач использовались экспериментальные фармакологические, фармацевтические, культуральные, морфологические, биохимические, иммунологические, функциональные и статистические методы исследований.

Положения, выносимые на защиту

1. В основе спаечного процесса в брюшной полости крыс и кроликов при моделировании гемоперитонеума (патент 2260854 РФ) лежат механизмы активации фибробластов с усилением их пролиферации, синтеза коллагена и гликозаминогликанов, активацией ядерного фактора транскрипции NF-κB, приводящей к блокированию апоптоза, ростом функциональной активности макрофагов и синтеза провоспалительных цитокинов TNF-α и IL-1.

2. БМКК производные фенилалкиламина (верапамил) и бензотиазепина (дилтиазем) в культурах активированных перитонеальных клеток и дермальных фибробластов оказывают выраженный фармакологический эффект в отношении избыточной активности перитонеальных фибробластов и макрофагов, ингибируя их пролиферативную активность, избыточную продукцию компонентов межклеточного матрикса и цитокинов, угнетая экспрессию транскрипционного ядерного фактора NF-κB перитонеальных и дермальных фибробластов. Эффективность верапамила в эквимольных дозах вдвое выше. Производные дигидропиридина (нифедипин) данных эффектов не проявляют.

3. Доза верапамила 0,1 мг/кг массы тела при внутривнутрибрюшинном введении не вызывает значимых изменений кардио- и гемодинамики и является оптимальной для профилактики спайкообразования, тормозя избыточное разрастание соединительной ткани путем регуляции активности фибробластов и макрофагов, приводящей к снижению уровня белковосвязанного оксипролина, гиалуроновой кислоты, провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 в перитонеальной жидкости крыс и кроликов.

4. Разработан оптимальный состав и технология оригинального антирубцового крема с верапамилем (патент 2900919 РФ). Соотношения лекарственного средства и вода-ланолин-вазелиновой основы 3:6:1 обеспечивает оптимальную скорость и полноту высвобождения верапамила из крема. В опытах *in vivo* изучено антирубцовое действие крема при накожном нанесении и установлена его высокая специфическая активность, проявляющаяся уменьшением площади рубцовой поверхности с трансформацией патологических рубцов кожи в физиологические. Применение крема является безболезненным, безопасным.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом (383 белые крысы, 64 кролика, 880 культур клеток) и корректным формированием изучаемых выборок, широким спектром и высокой информативностью современных методов исследования, многоуровневым тестированием *in vitro* и *in vivo*, положительными решениями по результатам патентной экспертизы результатов исследования с выдачей патентов РФ на изобретения (№№ 2260854, 2900919), адекватностью статистической обработки полученных данных с помощью параметрических (t-критерий Стьюдента) и непараметрических (критерий Манна-Уитни, Вилкоксона, χ^2 , критерий Колмогорова-Смирнова) методов анализа, публикациями результатов исследования в рецензируемых научных изданиях. Количество экспериментальных животных в каждой группе статистически обосновано по Lopez-Jimenez F. и достаточно для получения достоверных результатов. Первичная документация проверена комиссией в соответствии с приказом ректора ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России № 57-у от 19 июня 2017 года.

Апробация материалов диссертации

Материалы и основные положения диссертации представлены на IX национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2002); Всемирном конгрессе по клинической и иммунной патологии (Сингапур, 2002); Межрегиональной научно-практической конференции «Современные направления развития регионального здравоохранения» (Омск, 2005); Международной научно-практической конференции «Фармация Казахстана: интеграция науки, образования и производства» (Шимкент 2008); XLIII Всероссийской конференции «Актуальные проблемы теоретической, экспериментальной, клинической медицины и фармации» (Тюмень

2009); II научно-практической конференции с международным участием «Достижения клинической фармакологии в России» (Москва 2009); VI Дальневосточном региональном конгрессе с международным участием «Человек и лекарство» (Владивосток 2009); научно-практической конференции «Фармацевтическая наука и практика: достижения и перспективы» (Кемерово 2009); LXV региональной конференции по фармации и фармакологии (Пятигорск 2010); XVII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва 2010); II Международной конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий» (Казань 2011); XIX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва 2012); V Международной научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ» (Воронеж 2013); Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы фармацевтики и фармацевтического образования в России» (Чебоксары 2013); XXV Международной научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы» (Новосибирск 2013); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины XXI века» (Уфа, 2014); III Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины» (Актобе, 2014), II Международной научно-практической конференции «Отечественная наука в эпоху изменений: постулаты прошлого и теории нового времени» (Екатеринбург, 2014); заседании Межвузовского Комитета по этике (г.Москва, протокол №03-16 от 17 марта 2016 года); расширенном заседании кафедр фармакологии, клинической фармакологии, патофизиологии, клинической патофизиологии, факультетской терапии, госпитальной терапии, общей хирургии, анестезиологии и реаниматологии, общей химии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» МЗ РФ (г.Омск, протокол № 2 от 27 июня 2017 года).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 23 научных работ, в том числе 21 – в журналах, рекомендуемых ВАК для докторских диссертаций, и 2 (патенты РФ на изобретения) к ним приравненных. Изданы монография и учебно-методическое пособие.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 261 странице текста, проиллюстрирована 37 таблицами, 44 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 5 глав собственных исследований, главы обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, и списка литературы, содержащего 571 источник, из них 296 отечественных, 275 зарубежных авторов.

Личный вклад автора

Личное участие автора выразилось в выборе направления исследования, проведении научно-информационного поиска, анализе и обобщении данных литературы и собственных результатов. Автором лично разработан дизайн и структура, определены цель и задачи научной работы, проведены все этапы экспериментальных опытов, собраны и проанализированы результаты инструментальных и лабораторных исследований, создана база данных, проведена статистическая обработка материала, оформлены заявки на патенты, подготовлены монография и методическое пособие, написан текст диссертации. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от постановки задач и их реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и докладах. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Внедрение результатов исследования

Результаты проведенного исследования используются в учебном процессе кафедр фармакологии, клинической фармакологии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России (Омск), кафедры фармацевтической технологии Пятигорского фармацевтического института - филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, кафедры клинической фармакологии ФГБОУ ВО ТюмГМУ Минздрава России (Тюмень).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проведены на 383 белых крысах-самцах, массой 200 – 240 г. и 64 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла массой тела 2500 – 3200г., на 720 первичных культурах перитонеальных фибробластов и макрофагов и на 160 перевиваемых культурах дермальных фибробластов человека. Выполнено 1542 эксперимента. Проведены фармакотехнологические исследования по разработке антирубцового крема с верапамилем. Экспериментальные исследования проводили на базе ЦНИЛ ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» МЗ России. Животные, полученные из питомника Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск), содержались в стандартных условиях вивария ЦНИЛ ОмГМА на обычном рационе при свободном доступе к воде и пище в условиях нормального температурного и светового режимов, с соблюдением требований приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10.1983 г. и № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г., а также требований

Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, выводу их из эксперимента и последующей утилизации.

Спаечный процесс крысам и кроликам моделировали однократным инъекционным внутрибрюшинным введением стерильной аутокрови, забранной из дорсальной хвостовой вены у крыс и краевой вены уха кроликов, в количестве 1% массы тела (патент 2260854 РФ). Брюшинное спайкообразование регистрировали на 7-10 сутки. Моделирование крысам патологических рубцов кожи проводили по С.В.Логвинову и Е.Г. Арий (2002). Под ингаляционным масочным наркозом парами диэтилового эфира (ОАО «Медхимпром») полнослойно иссекали лоскут кожи 5x4 см² в центре спины в продольном направлении. Края кожного дефекта подшивали к подлежащим мышцам. На 55 сутки эксперимента формировались обширные грубые послеоперационные рубцы.

Исследования проводились *in vivo* на крысах, кроликах и *in vitro* в первичной культуре перитонеальных фибробластов и макрофагов крыс и перевиваемой культуре дермальных фибробластов человека. Дизайн экспериментального исследования фармакодинамических эффектов БМКК верапамила, дилтиазема и нифедипина представлен на рисунке 1. Эксперименты проводились в два этапа. На первом этапе разрабатывался способ моделирования внутрибрюшинных спаек. На втором этапе проведена оценка эффективности БМКК на разработанной модели спайкообразования (серии I, II, III на крысах и IV - на кроликах), в перевиваемой культуре дермальных фибробластов человека (Human Dermal Fibroblasts (Adult) производства Axol Bioscience (серия V), на крысах с патологическими кожными рубцами (серия VI). Также проведены технологические исследования и создан антирубцовый крем, содержащий 0,25% раствор верапамила гидрохлорида, ланолин, вазелин, димексид (патент 2290919 РФ).

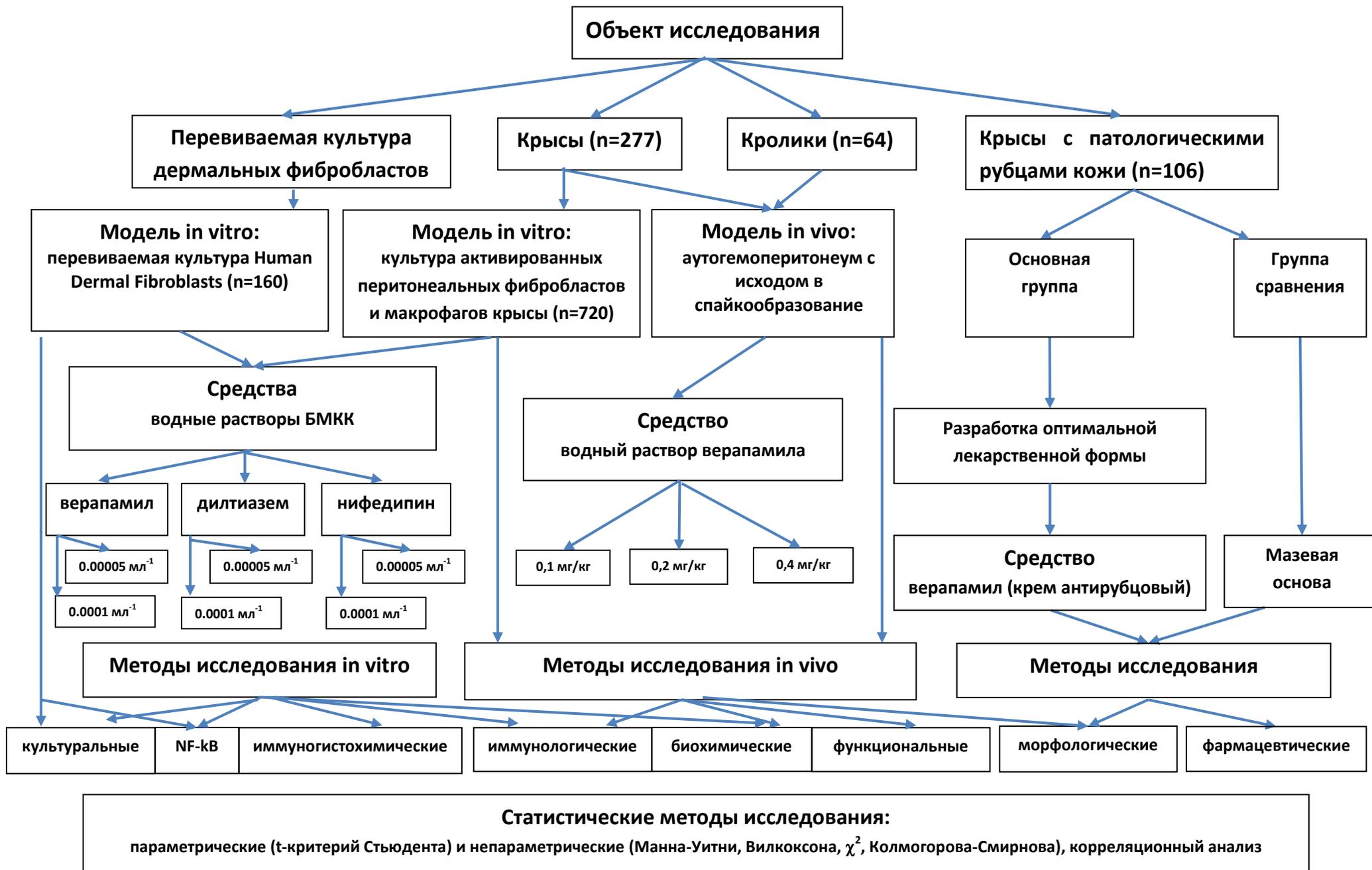


Рисунок 1. Дизайн исследования фармакодинамических эффектов БМКК верапамила, дилтиазема и нифедипина, направленных на регуляцию фиброгенеза

В I серии экспериментов исследовали морфологические характеристики спаек, биохимический состав и цитокиновый профиль перитонеальной жидкости.

Во II серии *in vitro* на клеточных культурах тестировали БМКК: верапамил, дилтиазем и нифедипин с подбором оптимальной концентрации для выявления у них свойств регуляции функции фибробластов и макрофагов при индукции спаечного процесса. Исследовали пролиферацию клеток: митотический индекс, маркер пролиферации Ki-67, активность ядерного фактора транскрипции NF-κB, темпы синтеза компонентов межклеточного матрикса: оксипролина, гиалуроновой кислоты, уровень провоспалительных цитокинов TNF-α, IL-1.

В III серии *in vivo* на крысах, после выявления БМКК, оказывающего наиболее выраженный фармакологический эффект в культуральном модуле - верапамила, провели оценку эффективности его действия при внутрибрюшинном введении с определением режима дозирования, исходя из необходимости минимизировать кардио- и гемодинамические эффекты препарата. Изучали влияние убывающих доз верапамила (0,4; 0,2; 0,1 мг/кг массы тела) на системную кардио- и гемодинамику (ЧСС, АД, УО, МОК, ОПСС). Регистрация параметров гемодинамики и функций миокарда проводилась исходно, до введения верапамила и через 15 минут, 2 часа и 4 часа после инъекции. Также исследованы процессы спайкообразования, синтез фибробластами компонентов межклеточного матрикса, цитокинсинтетическую активность макрофагов.

В IV серии *in vivo* на кроликах для подтверждения универсальности действия верапамила и разработанной модели на разных видах животных выполнены исследования с оценкой морфологических характеристик перитонеальных спаек, биохимического и цитологического состава перитонеальной жидкости.

V серия проведена *in vitro* на перевиваемой культуре дермальных фибробластов человека (Human Dermal Fibroblasts (Adult) производства Axol Bioscience) с оценкой влияния различных концентраций верапамила, дилтиазема и нифедипина на активность ядерного фактора транскрипции NF-κB.

В VI серии *in vivo*, после выбора верапамила в качестве действующего вещества лекарственной формы для местного применения, проведения технологических исследований и создания антирубцового крема, содержащего 0,25% раствор верапамила гидрохлорида, ланолин, вазелин, димексид (патент 2290919 РФ), на основании характеристики патологических кожных рубцов, данных биомикроскопии и морфологических исследований, обоснована эффективность и безопасность применения оригинального крема для профилактики и лечения патологических кожных рубцов.

Исследования первичных культур перитонеальных фибробластов и макрофагов крыс, а также перевиваемой культуры дермальных фибробластов человека проводили по стандартной технологии с использованием ростовой среды RPMI-1640 («Sigma») с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина, концентрации клеток 2×10^6 /мл, инкубированием в течение 24 часов в условиях абсолютной влажности, 37°C, 5% CO₂. Тестирование БММК верапамила (ОАО «Биосинтез», г. Пенза, Россия), дилтиазема (Diltiazem Hydrochloride Injection, Hospira, США), нифедипина (Bayer, Германия) проводили в концентрациях 0,00005 мл⁻¹ и 0,0001 мл⁻¹.

Приготовление ядерных экстрактов для определения содержания ядерного фактора NF-κB (p50/p65) в культурах как перитонеальных, так и дермальных фибробластов проводилось в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя BSM Diagnostics (США). Определение NF-κB (p50/p65) в образцах лизатов клеток проводили методом ИФА с помощью фотометра Multiscan MS (Labsystems, Финляндия), на реагентах BSM Diagnostics (США).

Пролиферативную активность фибробластов оценивали в обычном гистологическом исследовании с окраской по Романовскому-Гимза. С помощью бинокулярного светового микроскопа (Axioscop «Carl Zeiss», Германия) подсчитывали количество клеток с морфологическими признаками митозов. Иммуноцитохимическое исследование 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). Полученные препараты изучали с помощью люминесцентного микроскопа (Axiophot, «Carl Zeiss», Германия). Макрофагальную трансформацию моноцитов определяли по Демченко Т.А. (1980) путем 24-часового культивирования клеток с последующей окраской по Романовскому-Гимза и микроскопической оценкой с определением в процентах количества макрофагов.

Макроморфологическое исследование брюшной полости включало оценку выраженности спаечного процесса: его распространенность, локализацию спаек, их форму, деформацию органов спайками, наличие выпота. Материал для гистологических исследований подвергали стандартной проводке для световой микроскопии с заливкой в парафин с окраской срезов гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по Ван Гизону.

Количество основного маркера коллагена оксипролина в супернатантах клеточных культур и перитонеальной жидкости определяли методом Шараева П.Н. (1990), гиалуриновой кислоты - по карбазольной реакции Дише в модификации Шараева П.Н. с соавт. (1996).

Содержание провоспалительных цитокинов: TNF- α и IL-1 исследовали методом ИФА с помощью наборов Rat IL-1 β и TNF- α ELISA Development Kit (PeproTech, США) в соответствии с протоколом, предложенным производителем.

Изучение дозозависимого влияния верапамила на уровни систолического, диастолического и среднего АД, периферическое сосудистое сопротивление и показатели сердечного выброса проводили на полифизиографе МАИТ – 01 «Данко» производства ООО «Медицинские системы», город Ростов-на-Дону с электроманометрическим, электрокардиографическим и реографическим блоками. Измерение АД производили прямым методом путем катетеризации левой общей сонной артерии. Электрокардиографические показатели регистрировались в стандартных отведениях с помощью игольчатых электродов, вводимых под кожу конечностей. Большинство показателей системной гемодинамики рассчитывалось по данным интегральной реографии и ее первой производной. Расчет величины ударного объема сердца, минутного объема кровообращения, общего периферического сопротивления сосудов производили по стандартным формулам.

Фармакотехнологические методы включали: пробоподготовку, проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), способ приготовления антирубцового крема. В пробоподготовку входило получение модели биологической мембраны путем приготовления 6% раствора лецитина в кипящем 95 мас.% спирте этиловом и пропитывания им мелкопористых бумажных фильтров; диализ с нанесением на биологическую мембрану разработанного антирубцового крема, его погружение в воду, перемешивание и термостатирование с отбором через заданные промежутки времени проб для определения содержания верапамила методом ВЭЖХ. Разделения выполнены на жидкостном хроматографе "Shimadzu LC-20 Prominence" (Япония) со спектрофотометрическим детектором (R=254 нм). Способ приготовления крема заключался в расплавлении ланолина, вазелина и смешивании с раствором верапамила, нагревании эмульсии до 60°, затем охлаждении до 40° и обработке на кавитационной мельнице с последующим введением димексида. Разработанный антирубцовый крем содержит 0,25% раствор верапамила гидрохлорида, ланолин, вазелин, димексид в соотношении 30: 60:10: 5 (патент 2290919 РФ).

Исследование эффективности и безопасности антирубцового крема включало сравнительный анализ результатов экспериментальной терапии крыс с патологическими рубцами кожи антирубцовым кремом или его основой без верапамила при ежедневном 2-кратном втирании в зону рубца, а также нанесения крема нетравмированным крысам на здоровый участок кожи. Контроль эффективности и безопасности проводили через 10, 30 и 60 суток с момента формирования рубцов. Характеристику рубцовых повреждений кожи

проводили по шкале с оценкой в баллах с учетом размера, цвета и типа рубца, данных сравнительной биомикроскопии. Сумма показателей шкалы до 5 баллов расценивалась как хороший результат, от 5 до 10 баллов - как удовлетворительный, более 10 баллов - как неудовлетворительный. Сравнительную биомикроскопию рубцов проводили по А. А.Чернецову (1988) на устройстве для микроскопии кожи в отраженном свете с фокусированием полученного изображения на преобразователе световых сигналов в электрические. Морфологические исследования биоптатов кожи крыс проводили по общепринятым методикам с окраской гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону.

Размер выборки каждой группы для получения достоверных результатов определяли по формуле (Lopez-Jimenez F. et al., 1998). 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. Во всех случаях при возможности параметрического исследования применяли t-критерий Стьюдента. Если поставленные задачи не могли быть решены t-критерием, применяли непараметрические методы, критерии Манна-Уитни, Вилкоксона, χ^2 , критерий Колмогорова-Смирнова, при этом в каждом конкретном случае предпочтение отдавалось наиболее чувствительному критерию. Корреляционный анализ показателей был проведен с помощью определения коэффициента корреляции Пирсона или Спирмана. Количественный материал исследования представлен в виде графиков и таблиц. Средние выборочные значения количественных признаков приведены в виде M – среднее выборочное, m – стандартная ошибка среднего. Данные, не подчинявшиеся закону нормального распределения, представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25 и 75-перцентили). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Моделирование спаечного процесса (гемоперитонеума) в брюшной полости крыс и кроликов, проведенное однотипно путем внутрибрюшинного введения аутокрови, приводило на 7-10 сутки к образованию множественных соединительнотканых спаек, количество которых было сопоставимо (у крыс $8,2 \pm 1,8$, у кроликов $8,6 \pm 2,3$, $p > 0,05$). Спайки (висцерально-париетальные и висцеро-висцеральные) преимущественно локализовались в каудальном этаже брюшной полости и макроскопически были разделены на тяжевые, плоскостные, пленчатые, паутинные и смешанные. Микроскопически спайки были представлены волокнистой соединительной тканью, степень зрелости которой зависела от сроков наблюдения. Так от 7 к 10 суткам фибриновые наложения и рыхлая соединительная ткань с хаотичным

расположением коллагеновых волокон организовывалась до зрелой соединительной ткани с упорядоченным расположением коллагеновых волокон. Клеточный состав был представлен фиброцитами, фибробластами, мононуклеарами, встречались единичные плазматические, тучные и многоядерные клетки, 2/3 поверхности спаек было покрыто мезотелиоцитами. Уровень спайкообразования, локализация спаек, их микроскопические характеристики в экспериментах на крысах и на кроликах не различались.

Выраженное и распространенное спайкообразование сочеталось с высокой активностью перитонеальных фибробластов и клеток их микроокружения - макрофагов. Исследование коллагенсинтетической функции фибробластов, заключающееся в определении в перитонеальной жидкости кроликов белковосвязанного оксипролина, продемонстрировало рост показателя к 10 суткам после моделирования гемоперитонеума. Его значение превышало показатели контроля в 7 раз ($7,6 \pm 0,3$ мкмоль/л против $1,1 \pm 0,2$ мкмоль/л в контроле, $p < 0,05$). Уровень гиалуроновой кислоты в перитонеальной жидкости также превышал контрольные значения ($1,0 \pm 0,04$ ммоль/л против $0,3 \pm 0,01$ ммоль/л в контроле, $p < 0,05$). Установлена сильная прямая корреляционная связь между количеством спаек и содержанием оксипролина ($r = 0,95$, $p < 0,05$), количеством спаек и содержанием гиалуроновой кислоты ($r = 0,93$, $p < 0,05$). Увеличение значений показателей, характеризующих волокнистые структуры и аморфное вещество соединительной ткани, было взаимосвязано. Между количеством оксипролина и гиалуроновой кислоты имелась сильная прямая связь ($r = 0,86$, $p < 0,05$).

Сравнительный анализ содержания провоспалительных цитокинов в перитонеальной жидкости крыс на 10 сутки гемоперитонеума выявил, что количество TNF- α превышало контрольные значения в 25 раз ($251,1 \pm 7,3$ пг/мл против $10,3 \pm 0,4$ пг/мл, $p < 0,01$), усиление синтеза IL-1 достигало 3-х кратного увеличения ($12,7 \pm 0,8$ пг/мл против $3,7 \pm 0,3$ пг/мл в контроле). Связь изменений содержания цитокинов с выраженностью спайкообразования была подтверждена результатами корреляционного анализа. Выявлена прямая корреляция между TNF- α и числом спаек, IL-1 и числом спаек ($r = 0,55$, $p < 0,05$ и $r = 0,87$, $p < 0,01$ соответственно).

Исследование пролиферации активированных *in vivo* фибробластов крыс с гемоперитонеумом в культуре клеток показало, что их митотическая активность через 24 часа культивирования была высокой, митотический индекс в 5,3 раза превышал показатели неактивированных фибробластов интактных крыс ($12,3 \pm 0,4\%$ против $2,3 \pm 0,2\%$, $p < 0,05$) и коррелировал с числом соединительнотканых спаек ($r = 0,91$, $p < 0,05$). Экспрессия маркера пролиферации, напрямую связанного с делением клетки, белка Ki-67 в ядрах активированных фибробластов составила $32,6 \pm 0,7\%$, что было почти в 8 раз выше, чем у интактных крыс, где антиген Ki-67 маркировал $3,7 \pm 0,3\%$ клеток ($p < 0,05$).

Повышенная пролиферативная активность фибробластов сопровождалась увеличением их коллагенсинтетической активности. Уровень белковосвязанного оксипролина активированных фибробластов был в 4,2 раза выше, чем в культуре неактивированных клеток ($26,7 \pm 1,7$ против $6,5 \pm 0,4$ мкмоль/л, $p < 0,05$). Отмечена прямая корреляционная связь между количеством белковосвязанного оксипролина и числом спаек в брюшной полости крыс с гемоперитонеумом ($r = 0,78$, $p < 0,05$). Сравнительный анализ секретируемой фибробластами гиалуроновой кислоты, являющейся, наряду с коллагеном, одним из основных компонентов межклеточного матрикса соединительной ткани, выявил 3-кратное увеличение ее синтеза активированными *in vivo* перитонеальными фибробластами в результате моделирования у крыс гемоперитонеума ($1,6 \pm 0,12$ ммоль/л против $0,5 \pm 0,03$ ммоль/л, $p < 0,05$).

Исследование клеток микроокружения перитонеальных фибробластов выявило, что моноциты, полученные от крыс на 10 сутки гемоперитонеума, демонстрировали в культуре высокую способность к трансформации в макрофаги. В течение 24 часов культивирования $60,5 \pm 3,1\%$ из них дифференцировалось в макрофаги, что в 2,5 раза превышало показатели неактивированных клеток ($24,1 \pm 5,2\%$, $p < 0,05$). Следствием активации макрофагов при моделировании асептического воспаления брюшины являлась усиленная секреция ими провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1. Наиболее выраженные отклонения регистрировались при определении количества TNF- α , которое превышало значения в культуре неактивированных клеток в 19 раз ($321,3 \pm 21,1$ пг/мл против $17,1 \pm 1,8$ пг/мл, $p < 0,05$). Наряду с усилением выработки TNF- α , в культуре активированных клеток наблюдалось изменение уровня IL-1, которое достигало 3,6-кратного увеличения ($54,4 \pm 4,2$ пг/мл против $14,9 \pm 2,1$ пг/мл неактивированных клеток, $p < 0,05$). Высокий уровень IL-1 и TNF- α активировал фактор транскрипции NF- κ B. В ядерных лизатах культур клеток, полученных от крыс с гемоперитонеумом, показатели активации фактора транскрипции NF- κ B (p50/p65) были в 8 раз выше, чем в культуре неактивированных клеток ($671,7 \pm 21,3$ пг/мл против $84,2 \pm 27,6$ пг/мл, $p < 0,0001$), что является одним из объяснений избыточного роста соединительной ткани при спайкообразовании в результате блокирования апоптоза. Между количеством IL-1 и NF- κ B, TNF- α и NF- κ B, NF- κ B и числом спаек выявлена сильная положительная корреляционная связь с коэффициентами корреляции 0,78 - 0,81 ($p < 0,05$).

Таким образом, выявленное нами увеличение количества активированных фибробластов, обладающих высоким пролиферативным потенциалом с морфологическими признаками митозов и гиперэкспрессией Ki-67, усиление синтеза основных компонентов межклеточного матрикса соединительной ткани коллагена и гиалуроновой кислоты, избыточная активность макрофагов с увеличением продукции провоспалительных цитокинов

TNF- α , IL-1, активация фактора транскрипции NF- κ B с блокированием апоптоза клеток являются ключевыми звеньями избыточного формирования соединительной ткани, обуславливающего спайкообразование при гемоперитонеуме. Полученные равнозначные морфологические эквиваленты формирования спаечного процесса в брюшной полости разных видов лабораторных животных с регистрацией усиленной функциональной активности фибробластов и макрофагов и ее связи с формированием спаек свидетельствуют об универсальности и адекватности созданной модели спайкообразования для изучения механизмов формирования внутрибрюшинных спаек, проведения фармакодинамических исследований.

На втором этапе экспериментальных исследований мы оценивали дозозависимое влияния БМКК (верапамила, дилтиазема, нифедипина) на активированные фибробласты и макрофаги крыс с гемоперитонеумом с использованием клеточных технологий. Введение верапамила в культуру клеток в концентрациях 0,00005 мл⁻¹ и 0,0001 мл⁻¹ предотвращало чрезмерную активацию фибробластов (таблица 1). Митотическая активность клеток при указанных концентрациях верапамила снизилась на 33,3% и 58,5% от уровня контроля - культур без добавления лекарственных средств; количество Ki-67+ клеток уменьшилось на 39,0% и 59,2%. Верапамил, введенный в культуру перитонеальных клеток, 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 лекарственных средств. В присутствии верапамила в культуральной среде количество гиалуроновой кислоты также было ниже, чем в контроле. Верапамил останавливал наработку гиалуроновой кислоты на уровне 61,3% от показателей контроля. Степень снижения уровней данных веществ была более значима при концентрации препарата 0,0001 мл⁻¹ (таблица 1).

Дозозависимый эффект действия верапамила был обнаружен и при исследовании моноцитов-макрофагов. Активированные перитонеальные моноциты демонстрировали высокую способность к трансформации в макрофаги (таблица 1). Показатели макрофагальной трансформации моноцитов в культуре клеток с верапамилем были ниже, чем в контроле. Более значимое торможение чрезмерной пролиферации моноцитов прослеживалось в концентрации 0,0001 мл⁻¹. Исследование уровней TNF- α и IL-1 выявило снижение их синтеза под действием верапамила. Введение в культуру клеток верапамила в концентрации 0,00005 мл⁻¹ предотвращало повышение наработки активированными макрофагами данных цитокинов на уровне менее значимом, чем при использовании большей (0,0001 мл⁻¹) концентрации вещества (таблица 1).

Таблица 1. Влияние верапамила на морфофункциональные показатели перитонеальных фибробластов и макрофагов (M±m)

Показатели	Контроль	Верапамил (конц.)	
		0,00005 мл ⁻¹	0,0001 мл ⁻¹
МИ фибробластов, %	12,3±0,4	8,2±0,3*	5,1±0,1*^
Количество Ki-67 ⁺ клеток, %	32,6±0,7*	19,9±0,4*	13,3±0,6*^
Оксипролин, мкмоль/л	26,7±1,7	12,6±0,9*	8,9±0,2*^
Гиалуроновая кислота, ммоль/л	1,6±0,12	1,2±0,1*	0,98±0,05*
МТМ, %	60,5±3,1	48,1±1,7*	36,2±2,6*^
TNF-α, пг/мл	321,3±21,1	164,2±14,7*	97,4±6,8*^
IL-1, пг/мл	54,4±4,2	40,1±1,7*	27,1±2,6*^

Примечание: * - достоверность различий между показателями перитонеальных фибробластов и макрофагов в культуре клеток с добавлением верапамила и контролем, ^ - между концентрациями препарата, p<0,05.

Выявление наличия фармакологического эффекта у дилтиазема в концентрациях 0,00005 мл⁻¹ и 0,0001 мл⁻¹ в отношении перитонеальных фибробластов и макрофагов, оценка его выраженности по сравнению с верапамилем показали, что дилтиазем, хотя и снижает чрезмерную функциональную активность данных клеток соединительной ткани, но его нормализующее действие менее выражено, чем у верапамила (таблица 2).

Таблица 2 Влияние дилтиазема на морфофункциональные показатели перитонеальных фибробластов и макрофагов (M±m)

Показатели	Контроль	Дилтиазем (конц.)	
		0,00005 мл ⁻¹	0,0001 мл ⁻¹
МИ фибробластов, %	12,3±0,4	11,7±0,4	9,4±0,3*^
Количество Ki-67 ⁺ клеток, %	32,6±0,7*	27,2±0,9*	17,5±0,5*^
Оксипролин, мкмоль/л	26,7±1,7	18,9±1,2*	14,3±1,1*^
Гиалуроновая кислота, ммоль/л	1,6±0,12	1,5±0,1	1,28±0,06*

MTM, %	60,5±3,1	56,5±4,3	47,3±2,9*
TNF-α, пг/мл	321,3±21,1	253,1±9,3*	198,1±10,1*^
IL-1, пг/мл	54,4±4,2	47,2±2,1	39,8±2,3*^

Примечание: * - достоверность различий между 6-й группой (дилтиазем), и контролем (4-я группа), ^ - между концентрациями, $p < 0,05$.

Прослеживалась зависимость эффекта от концентрации препарата. Добавление к культуральной среде дилтиазема в концентрации $0,0001 \text{ мл}^{-1}$ приводило к статистически значимому в сравнении с контролем снижению уровней митозов фибробластов, количества Ki-67⁺ клеток, макрофагальной трансформации моноцитов, коллагена и гиалуроновой кислоты, TNF-α и IL-1. При меньшей концентрации дилтиазема ($0,00005 \text{ мл}^{-1}$) достоверных различий с контролем у 4 из 7 исследованных показателей не найдено (таблица 2).

Нифедипин в концентрациях $0,00005 \text{ мл}^{-1}$ и $0,0001 \text{ мл}^{-1}$ не оказывал действия на культуру активированных фибробластов и макрофагов, не влиял на процессы пролиферации клеток, количество оксипролина и гиалуроновой кислоты, уровни TNF-α и IL-1. Различия между изученными показателями в культурах клеток с добавлением нифедипина и без него были статистически недостоверны (таблица 3).

Таблица 3. Влияние нифедипина на морфофункциональные показатели перитонеальных фибробластов (M±m)

Показатели	Контроль	Нифедипин (конц.)	
		$0,00005 \text{ мл}^{-1}$	$0,0001 \text{ мл}^{-1}$
МИ фибробластов, %	12,3±0,4	12,4±0,5	11,5±0,3
Количество Ki-67 ⁺ клеток, %	32,6±0,7	31,9±1,3	30,1±1,9
Оксипролин, мкмоль/л	26,7±1,7	25,9±2,9	23,1±0,5
Гиалуроновая кислота, ммоль/л	1,6±0,12	1,6±0,1	1,48±0,08
MTM, %	60,5±3,1	61,3±2,7	56,1±3,4
TNF-α, пг/мл	321,3±21,1	297,1±9,8	271,2±14,2
IL-1, пг/мл	54,4±4,2	55,4±3,1	47,4±3,9

Исследование не описанного ранее фармакологического действия БМКК на клетки соединительной ткани показало, что верапамил и дилтиазем в концентрациях $0,00005 \text{ мл}^{-1}$ и $0,0001 \text{ мл}^{-1}$ оказывали нормализующее влияние на усиленную асептическим воспалением

брюшины пролиферативную активность и синтезирующую функцию фибробластов и макрофагов. Наиболее выраженный модулирующий эффект был выявлен при действии верапамила в концентрации $0,0001 \text{ мл}^{-1}$. В культурах клеток, инкубируемых с верапамилем, активность митотического процесса, экспрессии маркера пролиферации Ki-67 синтез белковосвязанного оксипролина, гиалуроновой кислоты, TNF- α и IL-1 уменьшались более значительно, чем с дилтиаземом. У нифедипина эффекта влияния на клетки соединительной ткани выявить не удалось.

При анализе экспрессии транскрипционного фактора NF-kB (p50/p65) в первичной культуре перитонеальных фибробластов и макрофагов крыс с гемоперитонеумом выявило, что его высокая активность ($671,7 \pm 21,3 \text{ пг/мл}$ в культуре активированных клеток против $84,2 \pm 27,6 \text{ пг/мл}$ в культуре неактивированных клеток $p < 0,0001$) при добавлении в инкубационную среду раствора верапамила или дилтиазема снижалась, при добавлении нифедипина не менялась (таблица 4). Введение верапамила в культуру клеток наиболее эффективно предотвращало чрезмерную активацию ядерного фактора транскрипции фибробластов: уровень NF-kB в ядерных лизатах культур снизился при концентрации верапамила $0,00005 \text{ мл}^{-1}$ на 15,8% ($p < 0,01$), при концентрации $0,0001 \text{ мл}^{-1}$ на 28,2% ($p < 0,001$).

Таблица 4. Изменение содержания NF-kB (пг/мл) под влиянием БМКК в ядерных экстрактах перитонеальных фибробластов и макрофагов крысы ($M \pm m$).

Показатели	концентрация	
	$0,00005 \text{ мл}^{-1}$	$0,0001 \text{ мл}^{-1}$
верапамил	$565,1 \pm 16,7^{**}$	$482,4 \pm 26,5^{***}$
дилтиазем	$650,5 \pm 31,2^{\wedge}$	$570,5 \pm 21,8^{**\wedge}$
нифедипин	$677,9 \pm 30,3^{\wedge}$	$607,9 \pm 32,2^{\wedge}$
Контроль (без лекарственных средств) $671,7 \pm 21,3$		

Примечание: * - достоверность различий с группой без введения лекарственных средств, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. \wedge - достоверность различий между группой с верапамилем и дилтиаземом, верапамилем и нифедипином ($p < 0,05$).

Добавление дилтиазема в культуру перитонеальных клеток вызывало менее значимое, в сравнении с верапамилем, уменьшение активности NF-kB. Его уровень был ниже значений контроля на 15,1% ($p < 0,01$) только при концентрации дилтиазема $0,0001 \text{ мл}^{-1}$, при меньшей концентрации препарата показатели от контрольных значений не отличались (таблица 4). Сравнительный анализ уровней активированного NF-kB при добавлении в среду верапамила

или дилтеазема выявил достоверное различие показателей ($p < 0,05$). Нифедипин не оказывал влияния на активность ядерного фактора транскрипции (таблица 4).

Исследование транскрипции NF-kB (p50/p65) в перевиваемой культуре дермальных фибробластов человека показало, что стимуляции его активности TNF- α приводила к 5-кратному повышению уровня NF-kB (таблица 5) относительно контрольных значений (150 пг/мл). Введение верапамила в культуральную среду предотвращало активацию ядерного фактора транскрипции NF-kB, останавливая его наработку в течении 24 часов инкубации с 0,00005 мл⁻¹ препарата на уровне 87,5% ($p < 0,05$), с 0,0001 мл⁻¹ - на уровне 57,0% ($p < 0,001$) от контрольных показателей (таблица 5).

Таблица 5. Изменение содержания NF-kB (пг/мл) под влиянием БМКК в ядерных экстрактах культуры Human Dermal Fibroblasts (Adult)

Показатели	концентрация	
	0,00005 мл ⁻¹	0,0001 мл ⁻¹
верапамил	631,7±16,5*	411,4±19,7***
дилтиазем	737,3±22,1^	765,7±34,7^
нифедипин	720,2±32,1^	771,1±24,5^^
Контроль (без лекарственных средств) 721,3±22,6		

Примечание: * - достоверность различий с группой без введения лекарственных средств, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. ^ - достоверность различий между группой с верапамилем и дилтиаземом, верапамилем и нифедипином ($p < 0,05$).

Дилтиазем и нифедипин не оказывали существенного действия на нормализацию гиперпродукции активированного транскрипционного ядерного фактора NF-kB (p50/p65) дермальными фибробластами (таблица 5).

Таким образом, сравнение результатов действия БМКК на активность транскрипционного ядерного фактора NF-kB (p50/p65) в первичной культуре перитонеальных клеток крыс и в перевиваемой культуре дермальных фибробластов человека выявило высокую фармакологическую активность верапамила. Эффект препарата был дозозависим. Выявленные закономерности служат фармакодинамическим объяснением механизма плейотропного эффекта верапамила, направленного на подавление избыточного образования соединительной ткани.

Для определения оптимального дозового режима интраперитонеального введения верапамила с минимизацией действия на сердечно-сосудистую систему в эксперименте изучено влияние убывающих доз верапамила (0,4; 0,2; 0,1 мг/кг массы тела животного) на системную кардио- и гемодинамику белых крыс. Установлено, что выраженное и достоверное влияние на гемодинамику верапамил оказывал в дозах 0,4 и 0,2 мг/кг массы тела животного при внутрибрюшинном введении в течение четырех и более, либо первых двух часов наблюдения соответственно. При этом регистрировались достоверные отрицательный хронотропный (снижение ЧСС с $401,6 \pm 5,1$ до $317,8 \pm 10,0$ мин⁻¹; $p < 0,05$), кардиодепрессивный (уменьшение сердечного выброса – УО с $0,12 \pm 0,005$ до $0,09 \pm 0,005$ мл; $p < 0,05$), артериолодилатирующий (снижение ОПСС с $0,27 \pm 0,02$ до $0,18 \pm 0,01$ дин·см⁻⁵/103; $p < 0,05$) и гипотензивный (снижение среднего АД с $110,8 \pm 2,8$ до $96,5 \pm 2,9$ мм. рт. ст.; $p < 0,05$) эффекты верапамила, возникавшие уже к 15 минуте действия препарата. Наличие выраженных сердечно-сосудистых эффектов верапамила в дозах 0,4 и 0,2 мг/кг массы тела животного свидетельствовало о том, что для достижения поставленной цели данные дозы были избыточными.

При введении верапамила в дозе 0,1 мг/кг массы тела животного показатели, характеризующие работу сердца и состояние кровообращения, оставались неизменными и сопоставимыми с исходными данными в течение всего срока наблюдения. В данной дозе основные фармакологические свойства верапамила не проявлялись: показатели, характеризующие работу сердца и состояние кровообращения, оставались на уровне исходных данных в течение 15 минут (ЧСС от $401,5 \pm 5,1$ до $393,3 \pm 4,4$ мин⁻¹, $p > 0,05$; среднее АД от $110,8 \pm 2,9$ до $109,3 \pm 1,5$ мм рт. ст., $p > 0,05$; УО с $0,11 \pm 0,005$ до $0,11 \pm 0,005$ мл, $p > 0,05$), 2 часов (ЧСС от $401,5 \pm 5,1$ до $394,2 \pm 4,7$ мин⁻¹, $p > 0,05$; среднее АД от $110,8 \pm 2,9$ до $108,8 \pm 1,3$ мм рт. ст., $p > 0,05$; УО с $0,11 \pm 0,005$ до $0,11 \pm 0,002$ мл, $p > 0,05$) и 4 часов (ЧСС от $401,5 \pm 5,1$ до $399,7 \pm 4,5$ мин⁻¹, $p > 0,05$; среднее АД от $110,8 \pm 2,9$ до $109,2 \pm 1,1$ мм рт. ст., $p > 0,05$; УО с $0,11 \pm 0,005$ до $0,11 \pm 0,005$ мл, $p > 0,05$) после инъекции препарата. Следовательно, оптимальной для изучения влияния верапамила на процессы спайкообразования в брюшной полости является доза 0,1 мг/кг массы тела животного, не вызывавшая при внутрибрюшинном введении значимых и достоверных изменений кардио- и гемодинамики.

Внутрибрюшинное введение верапамила в дозе 0,1 мг/кг массы тела животного, одновременно с моделированием гемоперитонеума, принципиально меняло морфологическую картину спаечного процесса в брюшной полости. Количество спаек достоверно ($p < 0,05$) уменьшилось и составило $0,20 \pm 0,04$ у крыс и $0,23 \pm 0,02$ у кроликов с гемоперитонеумом против $8,2 \pm 1,8$ и $8,6 \pm 2,3$ соответственно у животных без профилактического введения верапамила. Среди единичных идентифицированных спаек преобладали висцеро-париетальные. Висцеро-висцеральные спайки (с сальником, печенью, селезенкой, кишечником,

мочевым пузырем) отсутствовали. Не было обнаружено тяжевых и плоскостных спаек. В небольшом количестве выявлялись пленчатые, паутинные и смешанные спайки. Очевидно, что число перитонеальных спаек в условиях нашего эксперимента явилось своеобразной характеристикой реактивности брюшины и ее изменений под действием верапамила. На 7 сутки после моделирования гемоперитонеума и введения в брюшную полость верапамила как у крыс, так и у кроликов спайки были представлены молодой грануляционной соединительной тканью, в которой присутствовали фибробласты, фиброциты, единичные многоядерные клетки. К 10 суткам формировалась созревающие соединительнотканые спайки с хаотичным расположением коллагеновых волокон с преобладанием фибробластов и фиброцитов.

Профилактическое введение верапамила крысам и кроликам определило снижение содержания белковосвязанного оксипролина (до $5,4 \pm 0,3$ мкмоль/л против исходных $7,5 \pm 0,6$ мкмоль/л у крыс и до $6,6 \pm 0,1$ мкмоль/л против исходных $7,6 \pm 0,3$ мкмоль/л у кроликов; $p < 0,05$ для обоих видов животных) в перитонеальной жидкости к 10 суткам после моделирования гемоперитонеума. Установлена прямая и тесная корреляционная связь между количеством спаек и содержанием исследуемого биохимического субстрата в перитонеальной жидкости как в группе животных без профилактического введения лекарственных средств ($r=0,92$, $p < 0,05$), так и при воздействии верапамила ($r=0,76$, $p < 0,05$). Сопоставление уровней гиалуроновой кислоты в перитонеальной жидкости кроликов с гемоперитонеумом без введения верапамила и в группе животных, получивших данное лекарственное средство одновременно с моделированием асептического воспаления брюшины, также выявило достоверное снижение ее уровня (до $0,8 \pm 0,02$ мкмоль/л против $1,0 \pm 0,04$ мкмоль/л в контроле, $p < 0,05$) в результате действия верапамила. При этом установлена прямая корреляция между числом перитонеальных спаек и уровнем гиалуроновой кислоты в перитонеальной жидкости ($r=0,69$, $p < 0,05$).

Активность верапамила как регулятора чрезмерной активности фибробластов при асептическом воспалении брюшины была подтверждена нами *in vivo* на разных видах животных. Внутривнутрибрюшинное введение верапамила одновременно с моделированием гемоперитонеума предотвращало чрезмерную активацию клеток моноцитарно-макрофагального ряда, снижая избыточную продукцию провоспалительных цитокинов: TNF- α и IL-1. Введение верапамила предотвращало избыточную выработку TNF- α в среднем на уровне $104,1 \pm 42,2$ пг/л ($p < 0,01$), IL-1 на уровне $3,3 \pm 1,2$ пг/л ($p < 0,01$), что было соответственно в 2 и 3 раза ниже, чем в экспериментальной группе без лечения. При этом содержание IL-1 не отличалось от уровня контроля – интактных животных без гемоперитонеума ($3,2 \pm 0,9$ пг/л). Нормализация активности перитонеальных макрофагов, моделирующих, в том числе и через систему цитокинов, коллагенсинтезирующую функцию фибробластов, под действием

верапамила внесла свой вклад в предотвращение перитонеального спайкообразования при асептическом воспалении брюшины.

Доказанная оптимизация функций фибробластов и образования соединительной ткани под действием верапамила у разных видов лабораторных животных, а также универсальность его действия на молекулярные механизмы активации перитонеальных фибробластов крысы и дермальных фибробластов человека явились патогенетическим обоснованием использования верапамила как средства профилактики и лечения патологических кожных рубцов. Полученный экспериментальный материал послужил основанием для создания новой лекарственной формы для местного применения – антирубцового крема с верапамилем.

Трансдермальная лекарственная форма верапамила – антирубцовый крем (патент 2290919 РФ) разработана в соответствии с традиционной схемой создания наружных лекарственных форм, предусматривающей: обоснование содержания действующих веществ; выбор оптимальных вспомогательных компонентов (основы, консервантов), и на заключительном этапе - исследование фармакологической активности предложенного состава крема.

Верапамил выбран действующим веществом антирубцового крема на основании доказательств *in vitro* и *in vivo* эффективности по предотвращению избыточного формирования заместительной соединительной ткани.

При выборе состава основы крема были исследованы следующие композиции:

1. Вода-вазелин-эмульгатор Т2
2. Вода-ланолин-вазелин
3. Стеарин-вазелиновое масло-карбонат натрия-карбонат калия-вода
4. Воск-спермацет-ланолин-персиковое масло-вода

Установлено, что основа вода-ланолин-вазелин оптимальна по водно-жировому балансу и лучше прочих способствует проникновению препарата через кожу в ткань рубца. В качестве консервирующего, противовоспалительного, антимикробного и противоотечного компонента, а также для повышения проникающей способности крема в состав введен димексид в количестве 4-6 мас.%. При биофармацевтическом изучении биодоступности действующего вещества изучены 5 смесей (таблица 6), содержащих различные количественные композиции антирубцового крема.

Таблица 6. Количественные комбинации компонентов антирубцового крема в 5 экспериментальных смесях.

Компоненты	Смесь (содержание вещества, мас. %)				
	1	2	3	4	5
Ланолин безводный	30	40	50	60	70
Вазелин	23	19	15	11	7
Димексид	7	6	5	4	3
0,25 % р-ра верапамила	40	35	30	25	20
Всего:	100	100	100	100	100

Проведен диализ каждой смеси через полупроницаемую мембрану с отбором диализата и определением в нем количества верапамила методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления в изократическом режиме. Результаты послужили основанием выбора оптимального соотношения лекарственного средства и вода-вазелин-ланолиновой основы в используемых смесях, обеспечивавшего лучшую скорость и полноту высвобождения верапамила из крема, должную растекаемость и влагоемкость крема. Соотношение массовых долей указанных компонентов, обоснованное теоретически и подтвержденное стендовыми испытаниями, легло в основу создания антирубцового крема следующего состава:

раствор верапамила 0,25% - 25-35% ; ланолин - 40-60%; вазелин – 11-19%;
димексид - 4-6%

Экспериментальная терапия верапамил-содержащим кремом в течение первых 10 дней показала эффективность у 65% крыс: рубцы стали более гладкими, с тенденцией к выравниванию до уровня здоровой кожи. Окраска рубцов из ярко-красной, цианотичной трансформировалась в розовую. Более чем в половине случаев при пальпации исчезла болезненность. Через 30 дней лечения произошло уменьшение площади рубцов на 12%. У 82% крыс цвет рубцов стал светло-розовым, высота рубцов в 65% сравнялась с уровнем кожи, они имели гладкую поверхность, легко образуя складку. Через 60 дней площадь патологических рубцов уменьшилась на 25%, у 87% животных рубцы стали тонкими, светлыми, безболезненными при пальпации. Оценка эффективности в баллах показала хороший результат у крыс, пролеченных верапамилем (2,5 балла), и неудовлетворительный (11 баллов) у крыс группы сравнения с нанесением на рубцы основы крема без верапамила.

Проведение биомикроскопии кожи показало, что интенсивность поглощения светового потока поверхностью рубца при лечении верапамилем регрессирует, возвращаясь к показателям здоровой кожи. В динамике эти изменения носили плавный нарастающий

характер: через 10 дней лечения показатели составили 8,0 у.е. у 64% крыс, получавших верапамил, и лишь у 18% крыс, его не получавших; через 30 дней - 14,5 у.е. соответственно у 81 и 21% крыс, через 60 дней - 18,5 у.е. у 93% крыс, леченых с верапамилом, и 41% без него.

При анализе рубцовой ткани белых крыс отмечены особенности ее строения в зависимости от длительности применения лекарственных препаратов. Через 10 суток после начала лечения изменений не выявлено. В динамике на 30 - 60 сутки уменьшалось число патологических рубцов и увеличивалась доля нормотрофических рубцов (таблица 7).

Таблица 7. Характеристика кожных рубцов у крыс, получавших местное лечение верапамилом

Вид рубцов	Формирование рубца	Окончательная трансформация		
		10 сут	30 сут	60 сут
С верапамилом (основная группа)				
Нормотрофические	2	8	16	29
Гипертрофические	33	27	20	8
Келоидные и гипертрофические	3	3	2	1
Без верапамила (группа сравнения)				
Нормотрофические	2	4	8	12
Гипертрофические	33	28	25	22
Келоидные и гипертрофические	3	6	5	4
Результаты сравнения	$\chi^2 = 0,0;$ $df = 2;$ $p = 1,0$	$\chi^2 = 2,5,$ $df = 2,$ $p = 0,28$	$\chi^2 = 7,3,$ $df = 2,$ $p = 0,027^*$	$\chi^2 = 8,3,$ $df = 2,$ $p = 0,016^*$
		$\chi^2 = 38,4, df = 10, p < 0,0001^*$		
*Различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$				

Морфологические исследования показали, что через 10 суток лечения существенных изменений в строении гипертрофических рубцов не произошло. Выявлялся папилломатоз эпителия в эпидермисе, клетки базального слоя гиперхромные с высоким ядерно-цитоплазматическим индексом, вакуольная дистрофия эпителиоцитов, грубые толстые коллагеновые волокна. Через 30 и 60 суток процессы трансформации патологических рубцов в нормотрофические под действием верапамила существенно усиливались. Через 30 суток применения верапамила определялись только единичные очаговые перивазальные

лимфогистиоцитарные инфильтраты. Исключительно в глубоких отделах гипертрофических рубцов выявлялось очаговое набухание с гомогенизацией коллагеновых пучков. Между пучками сформированных коллагеновых волокон определялись фибробласты и фиброциты. Через 60 суток у животных основной группы в рубцах пучки коллагеновых волокон приобретали вид структурно сформированных компактных образований, между которыми располагалось умеренное количество фиброцитов. Рубцы из гипертрофических превращались в нормотрофические. В поверхностных отделах рубцов преобладали расширенные капилляры со структурно сформированными стенками, в более глубоких слоях – немногочисленные артерии и артериолы с толстыми стенками из 3-4 рядов гладкомышечных клеток, волокнистых структур и единичных уплощенных эндотелиоцитов. В структуре эпидермиса встречались признаки гиперкератоза.

Нанесение антирубцового крема на неповрежденную кожу не вызывало признаков ее изменения. В течение всего периода наблюдения (60 сутки) на месте контакта крема с кожей признаки воспаления и/или аллергических реакций отсутствовали.

Таким образом, местное применение верапамила в составе антирубцового крема приводило к трансформации патологических рубцов кожи в нормотрофические. Это выражалось в более раннем структурном созревании сосудисто-стромальных элементов без гипертрофии. Использование верапамила усиливало репаративные процессы, укорачивало все фазы воспаления, блокировало гипертрофию и, в результате, приводило к преимущественному формированию физиологических рубцов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важнейшим итогом настоящей работы является экспериментально обоснованная концепция новой области медицинского применения лекарственных средств группы блокаторов медленных кальциевых каналов для регуляции образования соединительной ткани при спайко- и рубцовообразовании.

Проведенное фармакодинамическое исследование доказывает наличие у БМКК групп фенилалкиламинов (верапамил) и бензотиазепинов (дилтиазем) свойств, регулирующих активность фибробластов; при этом местное применение верапамила эффективно предотвращает у крыс и кроликов формирование перитонеальных спаек (в дозах, не влияющих на кардио- и гемодинамику) и патологических рубцов кожи.

Изучены и уточнены компоненты патогенеза спаечного процесса и образования патологических рубцов кожи, механизмы действия БМКК верапамила, дилтиазема, нифедипина на формирование заместительной соединительной ткани *in vivo* и *in vitro*. Исследования *in vitro* проведены в первичной культуре перитонеальных фибробластов крыс с гемоперитонеумом и

перевиваемой культуре дермальных фибробластов человека (производства Axol Bioscience). Способы *in vivo* основаны на запатентованной модели асептического перитонеального спайкообразования у крыс и кроликов, а также воспроизведении модели формирования патологических рубцов кожи. Наличие спаечного процесса, патологических рубцов кожи было подтверждено макро- и микроскопически. Получены равнозначные морфологические и функциональные эквиваленты формирования спаечного процесса в брюшной полости разных видов лабораторных животных.

Оценено влияние разных доз БМКК верапамила, дилтиазема, нифедипина на функции фибробластов и макрофагов, процессы пролиферации и ингибирования апоптоза, синтеза коллагена и цитокинов. Установлен препарат, обладающий наибольшей фармакологической эффективностью – верапамил, который и подвергся углубленному исследованию *in vivo* на разных видах животных.

В результате исследования клеточно-матриксных механизмов, реализующихся чрезмерным образованием соединительной ткани при спайкообразовании, установлено увеличение активности фибробластов с усилением митотической активности и экспрессии транскрипционного фактора NF-κB, темпов синтеза компонентов межклеточного матрикса коллагена и гликозаминогликанов, а также ростом пролиферативной активности макрофагов и избыточным синтезом ими провоспалительных цитокинов TNF-α и IL-1. Доказано наличие связи между активностью фибробластов, макрофагов и выраженностью спайкообразования.

При изучении дозозависимой регуляции активности фибробластов БМКК верапамиллом, дилтиаземом, нифедипином обнаружено подавление пролиферации и коллагенсинтетической функции фибробластов, снижение гиперактивности ядерного фактора транскрипции NF-κB, приводящего к ингибированию процессов апоптоза, торможение макрофагальной трансформации и темпов синтеза макрофагами провоспалительных цитокинов под действием верапамила или дилтеазема. У нифедипина данный эффект выявлен не был. Наиболее выраженный модулирующий эффект наблюдался у верапамила в концентрации 0,0001 мл⁻¹. Проведение исследований по экспрессии транскрипционных факторов в первичной культуре перитонеальных фибробластов крыс и в перевиваемой культуре дермальных фибробластов человека подтвердило наибольшую фармакологическую эффективность верапамила.

При исследовании верапамила в качестве противоспаечного средства *in vivo* на разных видах животных была определена максимальная переносимая доза для внутрибрюшинного введения, не вызывавшая значимых и достоверных изменений кардио- и гемодинамики, которая составила 0,1 мг/кг массы тела. На целостном организме крыс и кроликов

подтверждено выявленное в экспериментах *in vitro* нормализующее действие верапамила на чрезмерную активность фибробластов и макрофагов, темпы синтеза оксипролина, гиалуроновой кислоты, цитокинов, на интенсивность процессов спайкообразования.

Выраженная антианаболическая и антипролиферативная активность классического недигидропиридинового БМКК верапамила, однотипность влияния препарата на молекулярные механизмы активации перитонеальных и дермальных фибробластов позволили использовать именно его в качестве средства регуляции функции фибробластов при формировании патологических рубцов кожи и послужили основанием для разработки трансдермальной лекарственной формы, содержащей верапамил – антирубцового крема (патент 2290919 РФ). На основании результатов технологических и биофармацевтических исследований был осуществлен выбор оптимальной концентрации верапамила и предпочтительной основы крема, проведена оценка антирубцового крема в качестве средства предупреждения избыточного кожного фиброгенеза.

При экспериментальном изучении динамики изменений в патологических рубцах кожи крыс установлена эффективность крема, проявлявшаяся формированием физиологического рубца, уменьшением площади рубцовой поверхности, изменением цвета рубца, исчезновением болевых ощущений. Доказан факт более раннего структурного созревания рубца кожи без гипертрофии. Верапамил усиливал репаративные процессы, укорачивал все фазы воспаления, блокировал гипертрофию и, в результате, приводил к преимущественному формированию физиологических рубцов.

Можно констатировать, что проделанная работа позволила установить фармакодинамические закономерности и особенности действия различных групп БМКК по регуляции образования соединительной ткани при спайко- и рубцовообразовании и обосновать новые возможности использования БМКК верапамила для предотвращения образования спаек в брюшной полости и формирования патологических кожных рубцов. Создание новой лекарственной формы, содержащей верапамил - антирубцового крема и подтверждение его эффективности и безопасности явилось логичным завершением работы.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная модель перитонеального спайкообразования (патент 2260854 РФ) является адекватной и универсальной, поскольку получены функциональные и морфологические эквиваленты спаечного процесса, воспроизводимость модели на разных видах животных с идентичностью распространенности, локализации спаек, их морфологических характеристик.

2. Моделирование гемоперитонеума вызывает повышение (в среднем 6-кратное) пролиферации фибробластов и активности ядерного фактора транскрипции NF-κB, приводящей к блокаде процессов апоптоза, усиление темпов синтеза компонентов межклеточного матрикса - коллагена и гиалуроновой кислоты, увеличение функциональной активности макрофагов, синтеза провоспалительных цитокинов TNF-α и IL-1. Выявлена корреляционная связь интенсивности процесса спайкообразования и анаболизма соединительной ткани, уровней TNF-α, IL-1.
3. В культуре активированных при гемоперитонеуме клеток доказано наличие дозозависимого антипролиферативного и антианаболического эффектов у БМКК верапамила и дилтиазема. Верапамил обладает наиболее выраженным эффектом, снижая в среднем в 1,6 – 2,3 раза чрезмерную митотическую активность фибробластов и макрофагов, избыточную продукцию оксипролина и гиалуроновой кислоты, синтез TNF-α и IL-1. Эффекты дилтиазема даже в максимальной дозе менее значимы (в среднем на 35,5%), чем у верапамила. У нифедипина изученный фармакологический эффект не выявлен.
4. Активация разных типов фибробластов - перитонеальных фибробластов крысы и дермальных фибробластов человека - приводит к равнозначному (4,5 – 4,8-кратному) росту активных форм транскрипционного ядерного фактора. Верапамил и дилтиазем ингибируют NF-κB перитонеальных и дермальных фибробластов, и этот эффект дозозависим. Нифедипин не оказывает влияния на экспрессию NF-κB.
5. Верапамил в дозе 0,1 мг/кг массы тела при внутрибрюшинном введении не обладает хроно-, ино- и ангиотропным действием. Дозы верапамила 0,2 мг/кг и 0,4 мг/кг массы тела животного оказывают кардио- и гемодинамические эффекты.
6. Внутрибрюшинное введение верапамила крысам и кроликам в дозе 0,1 мг/кг массы тела оказывает выраженный ингибирующий эффект на процессы спайкообразования: тормозит чрезмерную активность фибробластов и макрофагов, уменьшает синтез оксипролина и гиалуроновой кислоты, провоспалительных цитокинов TNF-α и IL-1. Установлены взаимосвязи между числом перитонеальных спаек, содержанием оксипролина и гиалуроновой кислоты в перитонеальной жидкости крыс и кроликов, подвергшихся воздействию верапамила.
7. Впервые сконструирована мягкая лекарственная форма для наружного применения - антирубцовый крем, содержащий в качестве базового компонента верапамил (патент

2290919 РФ). Оптимизация состава крема обеспечивает стабильность при оптимальной биодоступности.

8. Накожное применение верапамила в составе оригинального крема является безболезненным и безопасным, проявляется ремоделированием патологического кожного рубца с усилением репаративных процессов и более ранним структурным созреванием сосу́дисто-стромальных элементов без гипертрофии, формированием физиологического рубца, уменьшением площади рубцовой поверхности, улучшением консистенции и изменением цвета, размягчением и уплощением, исчезновением болевых ощущений.
9. Доказано наличие у БМКК верапамила нового вида фармакологической активности – предотвращения роста избыточной соединительной ткани. На молекулярном, клеточном, организменном уровнях подтверждена универсальность фармакологической активности верапамила в отношении перитонеального спайкообразования и формирования патологических кожных рубцов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
Научные работы, опубликованные в рецензируемых научных журналах,
рекомендованных ВАК

1. Экспериментальная модель перитонеального спайкообразования / С. В. Скальский, Г. А. Шамрай, Т. И. Долгих, Б. А. Рейс, Т. Ф. Соколова, А. М. Кочетов, Т. В. Притыкина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, № 10. – С. 473-475.
2. Скальский, С. В. Влияние верапамила на продукцию противовоспалительных цитокинов перитонеальными мононуклеарами / С. В. Скальский // Вестник РАМН. – 2010. – № 3. – С. 33-35.
3. Скальский, С. В. Блокаторы медленных кальциевых каналов как средства профилактики послеоперационных перитонеальных спаек // Эндоскопическая хирургия. – 2011. – № 6. – С. 38-40.
4. Скальский, С. В. Влияние верапамила на процесс перитонеального спайкообразования в эксперименте / С. В. Скальский // Медицина в Кузбассе. – 2012. – Т. 11, № 3. – С. 15-18.
5. Скальский, С. В. Экспериментальное изучение верапамила как регулятора функции перитонеальных фибробластов и клеток микроокружения / С. В. Скальский, Г. А. Шамрай // Омский научный вестник. Сер. Ресурсы Земли. Человек. – 2012. – № 2 (114). – С. 72-75.
6. Изменение компонентов межклеточного матрикса соединительной ткани при экспериментальном спаечном процессе брюшной полости на фоне действия верапамила / С. В. Скальский, Т. Ф. Соколова, Д. А. Сычев, Е. В. Ананичева // Вестник ОмГАУ. – 2016. – № 2 (22) . – С. 171-176.
7. Скальский, С. В. Воздействие блокаторов медленных кальциевых каналов на перитонеальные клетки при моделировании спаечного процесса в брюшной полости / С. В. Скальский, Т. Ф. Соколова, Д. А. Сычев // Биомедицина. – 2016. – № 3. – С. 11-17.
8. Скальский, С. В. Фиброгенез как объект фармакологической регуляции: альтернативные возможности блокаторов медленных кальциевых каналов / С. В. Скальский, Д.А. Сычев // Врач. – 2016. – № 4. – С. 33-35.
9. Скальский, С. В. Влияние блокаторов медленных кальциевых каналов верапамила и дилтеазема на интенсивность процессов пролиферации и апоптоза фибробластов в условиях гиперплазии соединительной ткани при спайкообразовании / С. В. Скальский, Т. Ф. Соколова // Дальневосточный медицинский журнал. – 2017. – № 4. – С.77-80.
10. Скальский, С. В. Угнетение фибробластов модифицирует интенсивность спайкообразования при асептическом воспалении брюшины кроликов / С. В. Скальский, Т. Ф. Соколова, С. К. Зырянов // Успехи современной науки. – 2017. – Т. 5, № 1. – С. 153-159.

11. Соколова, Т. Ф. Оценка возможности применения блокаторов медленных кальциевых каналов, традиционно используемых в кардиологии для профилактики спайкообразования / Т. Ф. Соколова, С. В. Скальский, Н. Е. Турок // Казанский медицинский журнал. – 2017. – Т. 98, № 2. – С. 218-221.
12. Фармакотехнологические исследования по разработке оптимального состава антирубцового крема с верапамилом / С. В. Скальский, М. А. Огай, Т. Ф. Соколова, Е. А. Лукша, А. И. Сливкин // Вестник ВГУ. Серия Химия, биология, фармация. – 2017. – № 2 – С. 128-132.
13. Скальский, С. В. Функциональная активность перитонеальных фибробластов как объект изучения фармакодинамики блокаторов медленных кальциевых каналов / С. В. Скальский, Т. Ф. Соколова, Д. А. Сычев // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 7. – С. 32-36.
14. Охлопков, В. А. Эффективность использования верапамил-содержащего крема при развитии патологических (гипертрофических и келоидных) рубцов кожи / В. А. Охлопков, С. В. Скальский, Т. Ф. Соколова // Вестник дерматологии и венерологии. – 2017. – № 4. – С. 38-43.
15. Скальский, С. В. Влияние верапамила на формирование спаек при асептическом воспалении брюшины (экспериментальное исследование) / С. В. Скальский, Т. Ф. Соколова, Н. Е. Турок // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – Т. 26, № 3. – С. 119-126.
16. Соколова, Т. Ф. Некоторые молекулярные механизмы развития спаечного процесса (экспериментальное исследование) / Т. Ф. Соколова, С. В. Скальский, С. К. Зырянов // Успехи современной науки. – 2017. – Т. 2, № 12. – С. 35-39.
17. Скальский, С. В. Изменение процессов пролиферации и апоптоза фибробластов при образовании спаек в брюшной полости / С. В. Скальский, Т. Ф. Соколова, Д. А. Сычев // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2017. – Т. 14, № 4. – С. 369-374.
18. Скальский, С. В. Реактивность макрофагальной системы при спайкообразовании / С. В. Скальский, Т. Ф. Соколова // Врач. – 2018. – № 5. – С. 81-83.
19. Разработка оптимального состава антирубцового крема с верапамилом и его влияние на ремоделирование патологических рубцов кожи / С. В. Скальский, М. А. Огай, Т. Ф. Соколова, М.-Б. М. Оздоев // Здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – Т. 20, № 2. - С. 103-106.
20. Скальский, С. В. Морфологические особенности ремоделирования патологических рубцов кожи / С. В. Скальский, С. С. Степанов, Т. Ф. Соколова // Успехи современной науки. – 2018. – Т. 2, № 12.- С. 99-104.
21. Влияние блокаторов медленных кальциевых каналов на процессы пролиферации и коллагеногенеза фибробластов при образовании спаек в брюшной полости / Л.М. Кузякова, С.В. Скальский, Э.Ф. Степанова, М.А. Огай, Т.Ф. Соколова, А.В. Локарев, Е.В. Ковтун // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2018. - № 6. С. 26-31

Патенты РФ на изобретения

1. Пат. 2260854 Рос. Федерация (51) МПК G 09 B 23/28. Способ моделирования внутрибрюшинных спаек / С. В. Скальский, Г. А. Шамрай ; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО Омская гос. мед. акад. – № 2003134120/14 ; заявл. 24.11.2003 ; опубл. 20.09.2005, Бюл. № 26. – 3 с. : ил.
2. Пат. 2290919 Рос. Федерация (51). Антирубцовый крем / В. К. Федотов, С. В. Скальский, А. А. Ковалевский ; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО Омская гос. мед. акад. – № 2004121762/15 ; заявл. 15.07.2004 ; опубл. 10.01.2007, Бюл. № 1. – 3 с. : ил.

Монографии, учебные пособия

1. Скальский, С. В. Блокаторы медленных кальциевых каналов: новые возможности использования в качестве регуляторов образования соединительной ткани / С. В. Скальский, Т. Ф. Соколова. – Омск : Издательско-полиграфический центр ОмГМУ, 2017. – 135 с.
2. Скальский, С. В. Блокаторы медленных кальциевых каналов и их применение для профилактики и лечения патологических рубцов кожи : учебно-метод. пособие / С. В. Скальский, Т. Ф. Соколова А.А.Ковалевский – Омск : Издательско-полиграфический центр ОмГМУ, 2018. – 86 с.

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах

1. Скальский, С. В. Изменение интенсивности формирования келоидных рубцов и экспрессии нуклеарного фактора NF-kb дермальных фибробластов после применения блокатора медленных кальциевых каналов верапамила / С. В. Скальский, Т. Ф. Соколова // Сибирский медицинский журнал. – 2016. – № 2. – С. 39-42.
2. Скальский, С. В. Регуляция формирования соединительной ткани при спайкообразовании блокаторами медленных кальциевых каналов / С. В. Скальский, Т. Ф. Соколова, С. К. Зырянов // Фармакодинамика и фармакокинетика. – 2017. – № 4. – С. — 46-50.

Скальский Сергей Викторович (Российская Федерация)

**«Блокаторы медленных кальциевых каналов: новые возможности использования
в качестве регуляторов образования соединительной ткани»**

Диссертация посвящена выявлению закономерностей и особенностей фармакодинамики блокаторов медленных кальциевых каналов (БМКК) в качестве регуляторов образования соединительной ткани при спайко- и рубцовообразовании. Установлено *in vitro* (в первичной культуре перитонеальных фибробластов крыс и перевиваемой культуре дермальных фибробластов человека) и *in vivo* (крысы, кролики) наличие у верапамила и дилтиазема дозозависимого эффекта подавления чрезмерной пролиферации клеток и темпов синтеза фибробластами коллагена и гликозаминогликанов, со снижением гиперактивности антиапоптотического ядерного фактора транскрипции NF-κB, с торможением макрофагальной трансформации и темпов синтеза макрофагами провоспалительных цитокинов и отсутствие данного эффекта у нифедипина. Наибольшей фармакологической эффективностью обладает верапамил в концентрации 0,0001 мл⁻¹. Внутривентральное введение верапамила в дозе 0,1 мг/кг массы тела, не влияя на кардио- и гемодинамику, предупреждало образование перитонеальных спаек у крыс и кроликов. Местное применение верапамила в составе разработанного антирубцового крема предотвращало избыточный фиброгенез и формирование патологических рубцов кожи.

Sergey V. Skalsky (Russian Federation)

«Slow calcium-channel inhibitors: new possibilities of use as regulators of connective tissue formation»

The thesis is devoted to revealing regularities and peculiarities of pharmacodynamics of calcium-channel-blocking agents (CCBA) as the regulators of connective tissue formation in adhesion and cicatrization. It has been found *in vitro* (in the primary culture of the peritoneal fibroblasts in rats and in the passaged culture of dermal fibroblasts in human beings) and *in vivo* (in rats and rabbits) the presence of the dose-dependent effect of suppressing of excessive cellular proliferation and the rate of collagen and glycosaminoglycans synthesis by fibroblasts in verapamil and diltiazem; and the decrease of hyperactivity of NF-κB antiapoptotic nuclear transcription factor with inhibition of macrophage transformation and the rate of synthesis of pro-inflammatory cytokines by macrophages, and the absence of this effect in nifedipine. The highest pharmacological efficacy belongs to verapamil at a concentration of 0.0001 ml⁻¹. Intraperitoneal administration of verapamil at a dose of 0.1 mg/kg body weight, with no impact on the cardio- and hemodynamics, prevented the formation of peritoneal adhesions in rats and rabbits. Topical application of verapamil as a component of the anti-scar cream prevented the excessive fibrogenesis and pathological skin scars development.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД - артериальное давление

АК – антагонисты кальция

БМКК - блокаторы медленных кальциевых каналов

МИ – митотический индекс

МОК – минутный объем крови

МТМ – макрофагальная трансформация моноцитов

ОПСС - общее периферическое сосудистое сопротивление

ПОС – послеоперационные спайки

УО – ударный объем сердца

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЕСМ – внеклеточный матрикс

ER – эндоплазматический ретикулум

Ig - иммуноглобулины

IFN- интерферон

IL- интерлейкины

TGF- β - фактор роста соединительной ткани

TNF- α - фактор некроза опухоли-альфа

PDGF - тромбоцитарный фактор роста

ROS – оксидантная система