

ФИБРОГЕНЕЗ КАК ОБЪЕКТ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ: АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ БЛОКАТОРОВ МЕДЛЕННЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ

С. Скальский¹, кандидат медицинских наук,

Д. Сычев², доктор медицинских наук, профессор

¹Омский государственный медицинский университет

²РМАПО, Москва

E-mail: sergscalskiy@mail.ru

Обсуждаются возможности применения блокаторов медленных кальциевых каналов (БМКК) для регуляции процессов образования соединительной ткани. Обозначены основные патогенетические звенья фиброгенеза, обуславливающие целесообразность применения и эффективность БМКК. Приводятся результаты собственных исследований антифиброзного действия верапамила.

Ключевые слова: фармакология, фиброз, антифиброзная терапия, блокаторы кальциевых каналов.

Проблема избыточного образования соединительной ткани затрагивает фактически все сферы медицины: она актуальна в клинике внутренних болезней, хирургии, комбустиологии, косметологии, офтальмологии. Почти 45% случаев смерти в развитых странах мира приходится на хронические фибропролиферативные заболевания [1]. Пока не существует терапии, эффективно препятствующей избыточному фиброгенезу; возможности антифиброзной терапии определяются современными знаниями о его клеточно-молекулярных механизмах. Центральной фигурой в развитии фиброза являются миофибробласты, обладающие фенотипом, промежуточным между фенотипом фибробластов и гладкомышечных клеток, и при активации синтезирующие большое количество внеклеточного матрикса (ЕСМ). Медиаторы, влияющие на активность пролиферации миофибробластов и производство ЕСМ, многочисленны и подразделяются на профиброгенные и антифиброгенные [2]. Известно, что фибробластические клетки удаляются путем апоптоза на завершающей стадии заживления ран. Задержка или отсутствие индукции апоптоза фибробластов приводит к чрезмерному фиброгенезу, как, например, в келоидных рубцах [3].

Одним из ведущих мессенджеров, опосредующих большинство клеточных событий, является кальций (Ca^{2+}). Многие факторы роста и цитокины изменяют содержание Ca^{2+} в фибробластах. Внеклеточный Ca^{2+} попадает в клетку через множество ионных каналов. Ca^{2+} -каналы 3 типов особенно существенны для патогенеза фиброза [4].

1. Каналы с транзиторным рецепторным потенциалом представляют собой семейство независимых от напряжения Ca^{2+} -каналов, которые могут реагировать на разнообразные раздражители, в том числе на истощение пула внутриклеточного Ca^{2+} , сжатие и осмотический стресс.

2. Ca^{2+} -каналы Т-типа служат «кардиостимуляторами» ритмической активности в клетках разных типов. Они генерируют относительно небольшой и кратковременный пульсовый приток Ca^{2+} , который затем может вызвать другие Ca^{2+} -опосредованные и (или) зависимые от напряжения клеточные события.

3. Ca^{2+} -каналы L-типа играют ключевую роль в клетках многих типов, где они опосредуют изменения уровня Ca^{2+} в ответ на тонкие изменения мембранного потенциала, в том числе порожденные Ca^{2+} -каналами Т-типа [5].

Многие клеточные процессы Ca^{2+} -зависимы. Каким же образом такой, казалось бы, однотипный, распространенный повсеместно сигнал может вызвать столь специфические и разнообразные ответы? Одна из клеточных стратегий — «манипулирование» Ca^{2+} в разных частях клетки, когда повышение концентрации Ca^{2+} в одной зоне регулирует определенную функцию, в то же время уменьшая концентрацию Ca^{2+} в другом участке клетки, чтобы подавить другую функцию. Один из примеров этого — микродомены Ca^{2+} , регулирующие миграцию фибробластов в клетках линии Wi-38. В этих мигрирующих фибробластах низкая концентрация Ca^{2+} определяется по их переднему краю, где функционируют многочисленные эффекторные белки, опосредующие миграцию, для чего требуется повышенная концентрация Ca^{2+} . Однако по всей передней кромке клеток в регионе со сниженной концентрацией Ca^{2+} были найдены микродомены с достаточно высокой концентрацией Ca^{2+} и средним диаметром всего $5,27 \pm 0,05$ мкм [4].

Другая стратегия, используемая клетками для дифференцированной регуляции Ca^{2+} -зависимых событий, — модуляция Ca^{2+} в виде волн разной частоты, которая зависит от силы раздражающего стимула. Некоторые ферменты способны трансформировать информацию, закодированную в частоте Ca^{2+} -колебаний. Кальциевый модулин (Сmd) при связывании 4 ионов Ca^{2+} может активировать несколько эффекторов. Один из них — Ca^{2+} /Сmd-зависимые киназы (СамК). Фосфорилирование фактора транскрипции NF- κ B, связанного с его ингибитором I κ B, с участием СамК приводит к его высвобождению, позволяя NF- κ B транслоцироваться в ядро и промодировать транскрипцию генов [6].

Другой Сmd-эффектор — кальциневрин, который дефосфорилирует фактор транскрипции NFAT с транслокацией его в ядро и регуляцией транскрипции генов. Оптимальной для NF- κ B- и NFAT-опосредованной транскрипции является не постоянная концентрация Ca^{2+} , а повторяющиеся Ca^{2+} -колебания в определенном диапазоне частот. Другие Ca^{2+} -зависимые ферменты с иными кинетическими свойствами лучше стимулируются устойчивым повышением Ca^{2+} , чем периодическими Ca^{2+} -осцилляциями [4].

Среди прочих важных ферментов стоит упомянуть Ca^{2+} -зависимую протеазу кальпаин и S100 кальций-связывающие белки. После активации путем связывания Ca^{2+} эти белки могут взаимодействовать с эффекторами в цитозоле или транспортируются в ядро и взаимодействуют с факторами транскрипции. Модулятор гомеостаза кальция 1 связан с утечкой Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ER) и уменьшением поглощения Ca^{2+} ER, что влечет за собой существенное снижение ER Ca^{2+} -контента, вызывает «ER-стресс» и приводит к активации белка развернутого ответа (UPR). С активацией UPR непосредственно связаны пути, ведущие к усилению транскрипции и экспрессии генов. Кроме того, многие ER-связанные шапероны, отвечающие за сборку белков, являются Ca^{2+} -связывающими белками.

Таким образом, нарушение гомеостаза Ca^{2+} непосредственно влияет на ER-сборку белков, приводя к нарушению клеточного протеостаза. Показано, что активация UPR необходима для дифференцировки клеток, например В-клеток в плазматические клетки, моноцитов в макрофаги и эпителиальных клеток в бокаловидные клетки. Известно, что IRE1 α (сериин/протеинкиназа/эндорибонуклеаза) необходима для увеличения секреторной способности клетки. Тесная связь между гомеостазом Ca^{2+} и IRE1 α была показана, когда выключение IRE1 α привело к ускоренному высвобождению кальция из ER и усиленной гибели клеток. В совокупности эти данные указывают на жизненно необходимые и важные роли гомеостаза Ca^{2+} в регуляции протеостаза, транскрипции генов и клеточных процессах, связанных с дифференцировкой, пролиферацией и гибелью клеток [7].

В связи с изложенным представляет интерес группа *блокаторов медленных кальциевых каналов (БМКК)*. БМКК, по имеющимся данным, помимо основных кардиодинамических эффектов, оказывают влияние на процессы фиброгенеза и воздействуют на апоптоз. Это влияние недостаточно изучено, однако известно, что даже среди производных одной химической структуры есть препараты и стимулирующие, и подавляющие фиброгенез и апоптоз, более того, один и тот же препарат может проявлять разнонаправленные свойства [8, 9]. Кроме того, выяснено, что эти эффекты нередко являются дозозависимыми [8].

Изучение влияния БМКК на фиброгенез закономерно проводилось в первую очередь в связи с их применением по основным показаниям — при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Согласно многим данным, дигидропиридиновые БМКК подавляют формирование атеросклеротического поражения, угнетая образование активных форм кислорода и последующие воспалительные процессы в стенке сосудов. Кроме того, дигидропиридиновые БМКК подавляют экспрессию молекул адгезии, препятствуя таким образом адгезии моноцитов к эндотелиальным клеткам, которая считается одним из главных факторов в патогенезе атеросклероза. В гладкомышечных клетках дигидропиридиновые БМКК подавляют клеточную пролиферацию и миграцию *in vitro* и *in vivo*, в макрофагах снижают накопление и эстерификацию холестерина и увеличивают гидролиз его эфиров. Кроме того, дигидропиридиновые БМКК подавляют экспрессию матричных металлопротеиназ, влияющих на стабильность атероматозных бляшек. Антиатеросклеротические эффекты дигидропиридиновых БМКК частично опосредованы активацией рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом-гамма (PPAR- γ). Показано также дозозависимое ингибирующее влияние нифедипина, верапамила и эфонидипина на активацию NF- κ B [10].

Другое важное направление исследований — изучение влияния БМКК на фиброз легких разного генеза. Многочисленные данные указывают на то, что БМКК подавляют ЕСМ-продуцирующую функцию легочных фибробластов и ингибируют фиброгенез [11, 12]. Однако использование этих свойств БМКК в клинической практике ограничивается их кардиогемодинамическими эффектами, нивелирующими их антифиброгенное действие.

Апоптогенные свойства БМКК дают основания для их применения в онкологии. Дилтиазем в комбинации с ингибиторами протеасом *in vitro* инициирует апоптоз клеток рака предстательной железы, что позволяет уменьшить эффективные дозы лактацистина и бортезомида [13]. Верапамил в со-

четании с гипертермией инициирует апоптотическую гибель клеток рака толстой кишки [14].

Антифиброзный эффект верапамила достаточно давно и успешно используется при болезни Пейрони и контрактуре Дюпюитрена [1]. Получены многочисленные данные о применении верапамила при келоидных рубцах. По данным метаанализа, местные инъекции верапамила эффективны в профилактике и лечении келоидных и гипертрофических рубцов. Его эффективность сравнима с эффективностью инъекций кортикостероидов, а безопасность выше. Верапамил может быть эффективной альтернативой традиционным методам в профилактике и лечении келоидных и гипертрофических рубцов [15].

Влияние БМКК на спайкообразование изучалось в эксперименте. Верапамил при местном применении уменьшал послеоперационное внутрисуставное спайкообразование и образование послеоперационных эпидуральных спаек при ламинэктомии [16, 17].

В эксперименте на 207 лабораторных животных нами была изучена способность верапамила подавлять внутрибрюшинное спайкообразование. Введение верапамила одновременно с моделированием аутогемоперитонеума предотвращало чрезмерную активацию клеток моноцитарно-макрофагального ряда перитонеальной жидкости. На фоне введения верапамила количество моноцитов перитонеальной жидкости, способных к трансформации в макрофаги, было в 2 раза ниже, чем в группе сравнения ($p < 0,01$). Введение верапамила предотвращало повышение содержания фактора некроза опухоли- α (ФНО α) и интерлейкина-1, останавливая продукцию ФНО α в среднем на уровне в 2–3 раза более низком, чем в группе животных, не получавших лечения. Внутрибрюшинное введение верапамила сопровождалось достоверным ($p < 0,01$) снижением общего количества спаек [18, 19].

Имеющиеся данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего тщательного изучения антифиброзных свойств БМКК как *in vitro*, так и *in vivo*. Неоднородность ответа фибробластов разной локализации на введение БМКК и неоднозначность эффектов БМКК подчеркивают сложность и гетерогенность фиброзных реакций и свидетельствуют о необходимости разработки индивидуальных терапевтических подходов для конкретных заболеваний.

Литература

1. Wynn T., Ramalingam T. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease // *Nat. Med.* – 2012; 18 (7): 1028–40.
2. Spaca S., Giusti I., Rieder F. et al. Cellular and molecular mechanisms of intestinal fibrosis // *WJG.* – 2012; 18 (28): 3635–61.
3. Hinz B., Phan S., Thannickal V. et al. Recent Developments in Myofibroblast Biology: Paradigms for Connective Tissue Remodeling // *Am. J. Pathol.* – 2012; 180 (4): 1340–55.
4. Janssen L., Mukherjee S., Ask K. Calcium Homeostasis and Ionic Mechanisms in Pulmonary Fibroblasts // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (Online).* – 2015; 53 (2): 135.
5. Prakriya M., Lewis R. Store-operated calcium channels // *Physiol. Rev.* – 2015; 95 (4): 1383–436.
6. Ben-Johny M., Yue D. Calmodulin regulation (calmodulation) of voltage-gated calcium channels // *J. Gen. Physiol.* – 2014; 143: 679–92.
7. FollonierCastella L., Gabbiani G., McCulloch C. et al. Regulation of myofibroblast activities: calcium pulls some strings behind the scene // *Exp. Cell Res.* – 2010; 316: 2390–401.
8. Kawamura A., Miura S., Matsuo Y. et al. Azelnidipine, Not Amlodipine, Induces Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor From Smooth Muscle Cells and Promotes Endothelial Tube Formation // *Cardiol. Res.* – 2014; 5 (5): 145–50.

9. Li Y., Lorca R., Ma X. et al. BK Channels Regulate Myometrial Contraction by Modulating Nuclear Translocation of NF- κ B // *Endocrinology*. – 2014; 155 (8): 3112–22.

10. Ishii N., Matsumura T., Shimoda S. et al. Anti-atherosclerotic potential of dihydropyridine calcium channel blockers // *J. Atheroscl. Thromb.* – 2012; 19 (8): 693–704.

11. Mukherjee S., Kolb M., Duan F. et al. Transforming growth factor- β evokes Ca²⁺ waves and enhances gene expression in human pulmonary fibroblasts // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2012; 46: 757–64.

12. Costabel U. Emerging potential treatments: new hope for idiopathic pulmonary fibrosis patients? // *Eur. Respir. Rev.* – 2011; 20: 201–7.

13. Kaddour-Djebbar I., Choudhary V., Lakshmikanthan V. et al. Diltiazem enhances the apoptotic effects of proteasome inhibitors to induce prostate cancer cell death // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2012; 341 (3): 646–55.

14. Meggyeshazi N., Andocs G., Balogh L. et al. DNA fragmentation and caspase-independent programmed cell death by modulated electrohyperthermia // *Strahlentherapie und Onkologie*. – 2014; 190 (9): 815–22.

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

16. Li Y., Ma X., Yu P. et al. Intra-articular adhesion reduction after knee surgery in rabbits by calcium channel blockers // *Med SciMonit.* – 2014; 20: 2466–71.

17. Wang Z., Wang Y., Xie P. et al. Calcium channel blockers in reduction of epidural fibrosis and dural adhesions in laminectomy rats // *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* – 2014; 24 (1): 293–8.

18. Скальский С.В. Влияние верапамила на продукцию противовоспалительных цитокинов перитонеальными мононуклеарами // *Вестник РАМН*. – 2010; 3: 33–5.

19. Скальский С.В. Влияние верапамила на процесс перитонеального спайкообразования в эксперименте // *Медицина в Кузбассе*. – 2012; 11 (3): 15–8.

FIBROGENESIS AS AN OBJECT OF PHARMACOLOGICAL REGULATION: ALTERNATIVE ABILITIES OF SLOW-RELEASE CALCIUM CHANNEL BLOCKERS

S. Skalsky¹, *Candidate of Medical Sciences; Professor* **D. Sychev**², *MD*

¹*Omsk State Medical University*

²*Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow*

The paper discusses whether slow-release calcium channel blockers (SCCBs) may be used to regulate the processes of connective tissue formation. The main pathogenetic components of fibrogenesis, which determine the expediency of the administration and efficiency of SCCBs, are defined. The authors give the results of their own studies of the antifibrotic effect of verapamil.

Key words: pharmacology, fibrosis, antifibrotic therapy, calcium channel blockers.