

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЛЕРКАНИДИПИНА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Jiunn-Ren Wu^{a,b}, *Shu-Fen Liou*^c, *Shin-Wha Lin*^d, *Chee-Yin Chai*^e, *Zen-Kong Dai*^a, *Jyh-Chong Liang*^f, *Ing-Jun Chen*^d, *Jwu-Lai Yeh*^d

^a Division of Pediatric Pulmonology and Cardiology, Department of Pediatrics, Kaohsiung Medical University Hospital, Kaohsiung, Taiwan; ^b Department of Clinical Laboratory, Kaohsiung Municipal Hsiao-Kang Hospital, Kaohsiung, Taiwan; ^c Department of Pharmacy, Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan; ^d Department and Graduate Institute of Pharmacology, College of Medicine, Kaohsiung Medical University; ^e Departments of Pathology, College of Medicine, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan; ^f Department of Holistic Wellness, Chin Min Institute of Technology, Miaoli County, Taiwan

Резюме

Блокатор кальциевых каналов лерканидипин в настоящее время используется для лечения эссенциальной гипертензии и стенокардии. Целью данного исследования было уточнение антипролиферативного эффекта лерканидипина, а также изучение действия этого препарата на молекулярном уровне. Лабораторные методы (*in vitro*) и модель баллонного повреждения сонной артерии у крыс были использованы для изучения эффекта лерканидипина на пролиферацию гладких миоцитов сосудов (ГМЦС). Лерканидипин дозозависимо подавлял пролиферацию и миграцию ГМЦС при обработке культуры ГМЦС 10% фетальной сывороткой быка (*fetal bovine serum*, FBS) и сывороткой быка, содержащей тромбоцитарный фактор роста (*platelet-derived growth factor*, PDGF) в концентрации 20 нг/мл. Стимулируемая FBS и PDGF-BB внутриклеточная активация Ras, MEK1/2, ERK1/2, ядерного антигена пролиферирующих клеток (*proliferative cell nuclear antigen*, PCNA) и Akt достоверно подавлялась лерканидипином. В то же время лерканидипин не влиял на индуцируемое FBS и PDGF-BB фосфорилирование STAT3. Лерканидипин также подавлял фосфорилирование β -цепи PDGF-рецептора и образование активных форм кислорода (*reactive oxygen species*, ROS), вызываемое PDGF-BB. Лерканидипин блокировал индуцируемый FBS переход от G0/G1 к S-фазе клеточного цикла в синхронизированных клетках. *In vivo*, через 14 дней после баллонного повреждения, терапия лерканидипином в дозе 3 и 10 мг/кг приводила к достоверному уменьшению отношения неоинтима/медия. Подавление образования неоинтими под действием лерканидипина было обусловлено влиянием препарата на фосфорилирование ERK1/2. Полученные результаты свидетельствуют о том, что лерканидипин способен подавлять пролиферацию ГМЦС за счет ингибирования клеточных ROS, Ras-MEK1/2-ERK1/2 и PI3K-Akt. Эти данные могут иметь важное клиническое значение для профилактики рестеноза у человека.

Ключевые слова: лерканидипин, гладкие миоциты сосудов, тромбоцитарный фактор роста, MAP-киназа, активные формы кислорода.

1. Введение

При выполнении чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (ЧТКА) развивается повреждение эндокардиального и миокардиального слоев коронарной артерии, что приводит к утрате антитромбогенных свойств неповрежденных гладких миоцитов сосудов. Повреждение коронарных артерий и последующая пролиферация интимы могут запустить каскад реакций, включающих активацию тромбоцитов, образование тромбина и высвобождение митогенов, что в конечном итоге приводит к гиперплазии неоинтимы [1]. По данным множества исследований с использованием экспериментальных моделей атеросклероза, а также клинических испытаний, дигидропиридиновые антагонисты кальция обладают антиатеросклеротическим действием [2–5]. Несмотря на то, что точные механизмы этого антиатерогенного действия остаются недостаточно изученными, они могут включать протекцию эндотелия,

подавление пролиферации гладких миоцитов и анти-тромбоцитарные эффекты.

Тромбоцитарный фактор роста (*platelet-derived growth factor*, PDGF), высвобождаемый из тромбоцитов после их адгезии к поверхности поврежденного сосуда, может быть основным стимулом для процессов миграции и пролиферации гладких миоцитов [6]. PDGF стимулирует активацию p42/44 митоген-активируемой протеинкиназы (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) и регулируемой внеклеточными сигналами киназы 1/2 (*extracellular signal-regulated kinase* 1/2, ERK1/2), а также экспрессию фактора транскрипции в культуре гладких миоцитов сосудов (ГМЦС). ERK1/2 являются серин/треонин киназами, активируемыми под действием различных компонентов процессов клеточной пролиферации и дифференциации [4,7]. Имеются сообщения о том, что ERK1/2 активируются в стенке артерий после баллонного повреждения у животных, в различных

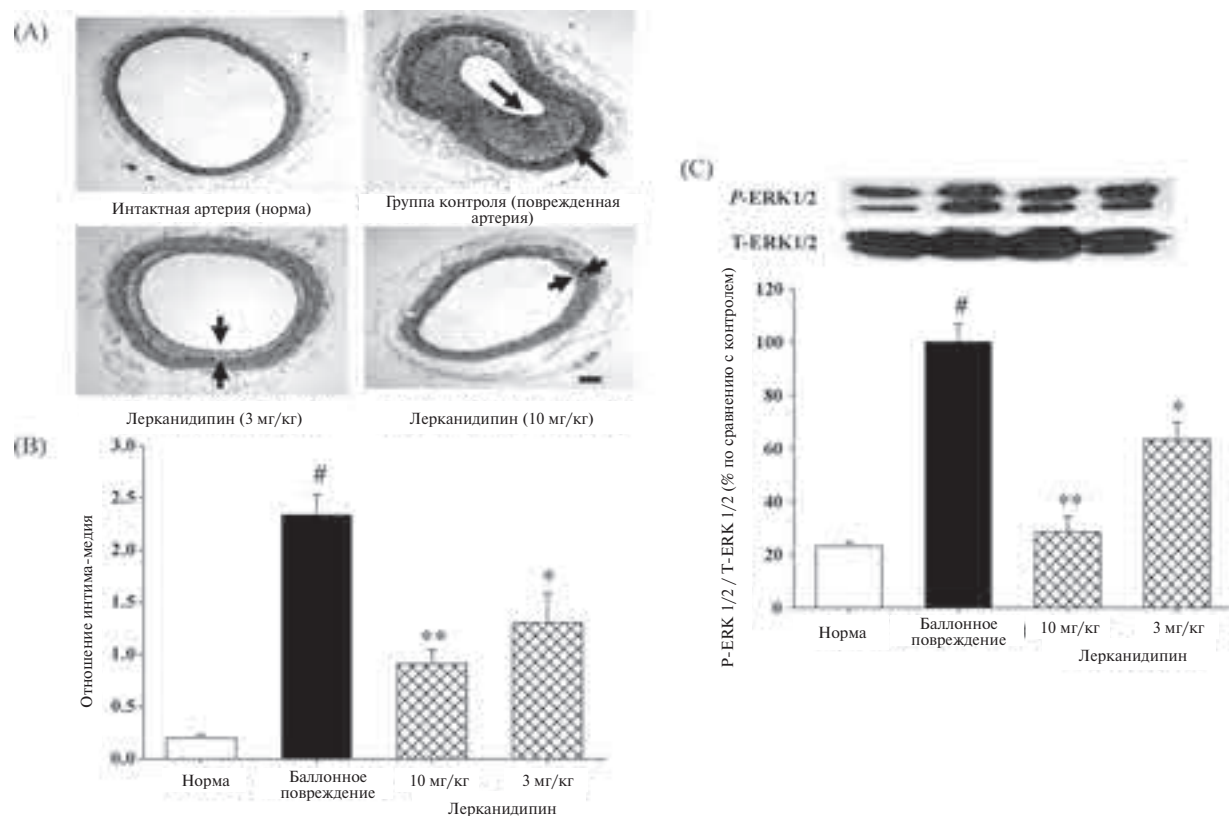


Рис. 1. (А) Типичный участок сонной артерии крысы из групп лерканидипина и контроля после баллонного повреждения. (В) На гисторамме показан эффект перорального приема лерканидипина на отношение неоинтима-медия через 2 недели после баллонного повреждения. (С) Эффект лерканидипина на фосфорилирование ERK1/2 в сонной артерии крысы, оцененный с помощью Вестерн-блота. Результаты представлены в виде средних величин \pm стандартных ошибок средних величин (СОС) ($n=8$ для каждой группы). [#] $P<0,01$ по сравнению с нормой; ^{*} $P<0,05$, ^{**} $P<0,01$ по сравнению с группой контроля. Стрелки указывают на участки формирования неоинтимы. Горизонтальная линия на рисунке (А) соответствует 100 мкм.

экспериментальных моделях [4,7,8]. Эти данные позволяют предположить, что MAPK играет роль связующего звена между повреждением артерий и пролиферацией ГМЦС при атеросклерозе, и, таким образом, вызываемая PDGF активация ERK1/2 может участвовать в патогенезе атеросклероза.

Лерканидипин является дигидропиридиновым антагонистом кальциевых каналов L-типа, который, согласно данным исследований *in vivo* и *in vitro*, блокирует кальциевые каналы L-типа и обладает выраженной сосудистой селективностью [9]. Лерканидипин характеризуется медленным началом и выраженной продолжительностью антигипертензивного действия, а также антиоксидантной активностью [10,11]. В клинической практике этот блокатор кальциевых каналов назначается для лечения эссенциальной гипертензии и стенокардии [10,12]. Недавно выполненные исследования показали, что лерканидипин подавляет пролиферацию ГМЦС *in vitro* [2,3]. В то же время, молекулярные механизмы подавления пролиферации ГМЦС остаются недостаточно изученными. Механизм Ras-ERK1/2 может участвовать в регуляции клеточной пролиферации и миграции [4,7,8]. Таким образом, целью данного исследования было уточнить, опосредует ли механизм Ras/MEK/

ERK подавление пролиферации ГМЦС под действием лерканидипина.

2. Материал и методы

2.1. Материал

Лерканидипин был предоставлен компанией Recordati (Милан, Италия). Перечисленные ниже материалы были приобретены у соответствующих компаний: модифицированная по методу Dulbecco среда Eagle (Dulbecco modified Eagle medium, DMEM) и фетальная сыворотка быка (fetal bovine serum, FBS) – у компании GIBCO BRL Life Technologies (Grand Island, Нью-Йорк, США); Fura-2/AM, PD98059, PDGF-BB, манумидин А, N-ацетилцистеин (N-acetylcysteine, NAC), антитела к β -актину гладких миоцитов и пропиридиум йодид – у компании Sigma Chemical (St. Louis, Миссури, США); 2',7'-дихлородигидрофлюоросцеин диацетат (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) – у компании Molecular Probes (Eugene, Орегон); антитела к p42/p44 MAPK, фосфорилированной p42/p44 MAPK, PDGF-R β , фосфорилированному PDGF-R β и ядерному антигену пролиферирующих клеток (proliferative cell nuclear antigen, PCNA) – у компании Upstate Biotechnology (Lake Placid, Нью-Йорк, США); анти-

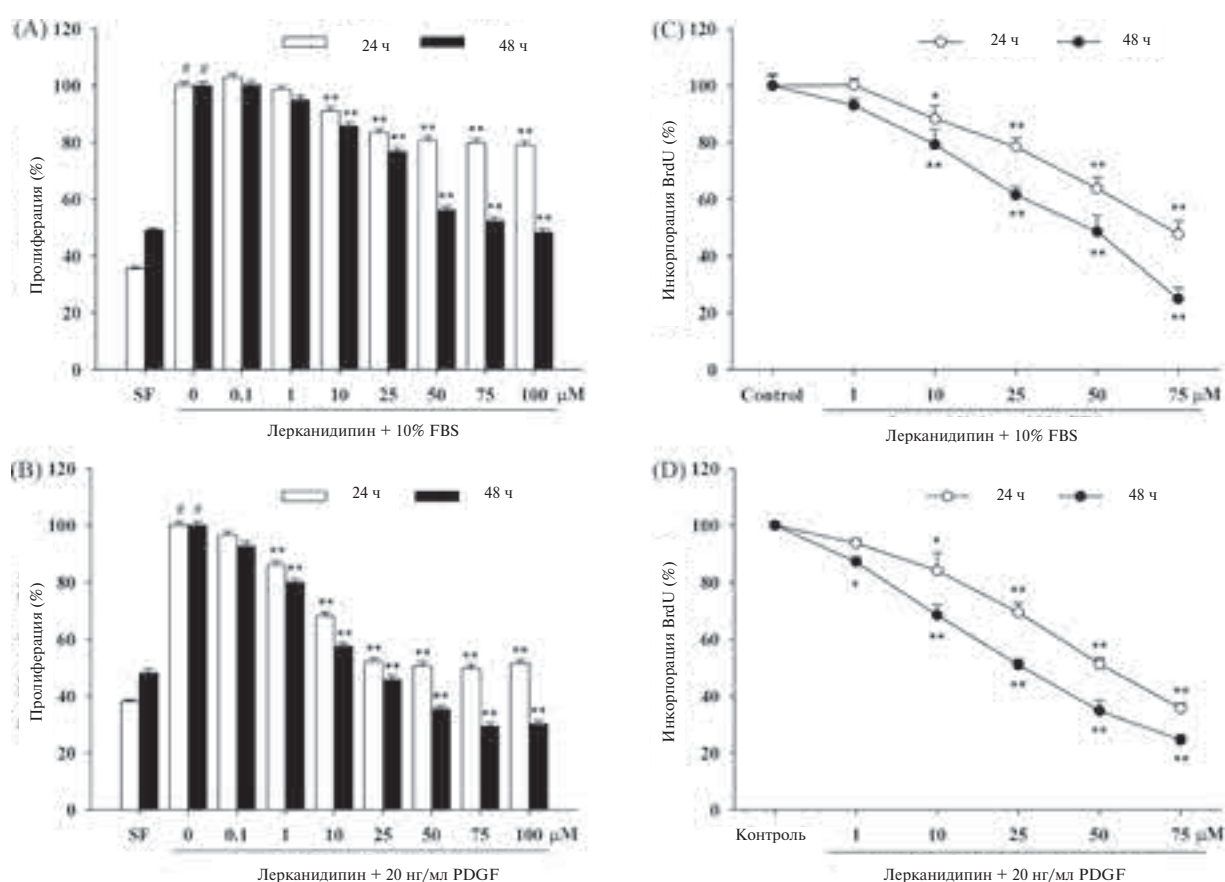


Рис. 2. Эффекты лерканидипина на вызываемую 10% FBS и 20 нг/мл PDGF-BB пролиферацию ГМЦС крысы и синтез ДНК. Через 24 и 48 ч инкубации в присутствии лерканидипина (0,1–100 μM) либо без него, жизнеспособность клеток оценивалась с помощью теста ХТТ (А и В) и анализа с инкорпорацией BrdU (С и D). Данные представлены в виде средних величин ± СОС, на основании 9 экспериментов. #P<0,01 по сравнению с группой без добавления сыворотки (serum-free, SF); *P<0,05, **P<0,01 по сравнению с клетками, обработанными FBS либо PDGF-BB.

тела к фосфорилированной Akt и STAT3 – у компании Cell Signaling (Beverly, Массачусетс, США); мембрана PVDF и набор для усиленной хемилюминесценции (enhanced chemiluminescence, ECL) – у компании PerkinElmer Life Sciences (Boston, Массачусетс, США); иммуноглобулины, конъюгированные с пероксидазой – у компании Calbiochem (Temecula, Калифорния, США); набор для клеточной пролиферации ХТТ [2,3-бис (2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксанилид, 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] и клеточной пролиферации ELISA, а также бромдеоксиуридин (bromodeoxyuridine, BrdU) – у компании Roche (Мангейм, Германия).

2.2. Модель баллонного повреждения

Данное исследование было выполнено в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных (National Academic Press, Washington, DC, 1996). Ответ артерий на повреждение изучался *in vivo*, на модели баллонной ангиопластики с использованием сонной артерии крысы

[13]. Крысам-самцам линии Wistar, с массой тела 350–400 г, была выполнена интраперитонеальная анестезия пентобарбиталом (40 мг/кг), с последующим выделением левой сонной артерии. После артериотомии эмболэктомический баллонный катетер Fogarty 2F вводился в левую наружную сонную артерию и проводился до уровня дуги аорты. Баллон трижды расширялся и извлекался, с вращением при постоянном уровне давления. Контралатеральная артерия (правая сонная артерия) оставалась интактной и служила в качестве индивидуального контроля. Свежеприготовленная суспензия лерканидипина (3 и 10 мг/кг/сут) в 0,5% растворе метилцеллюлозы вводилась через оральный зонд, один раз в день. Через 14 дней после баллонного повреждения животные забивались, и образцы тканей правой и левой сонной артерии фиксировались 4% параформальдегидом для последующего морфометрического анализа. Выраженность формирования неоинтимы оценивалась с помощью компьютерной планиметрии окрашенных гистологических препаратов. Отношение интима/медия рассчитывалось на основании средних значений этих показателей [13]. Оставшиеся участки

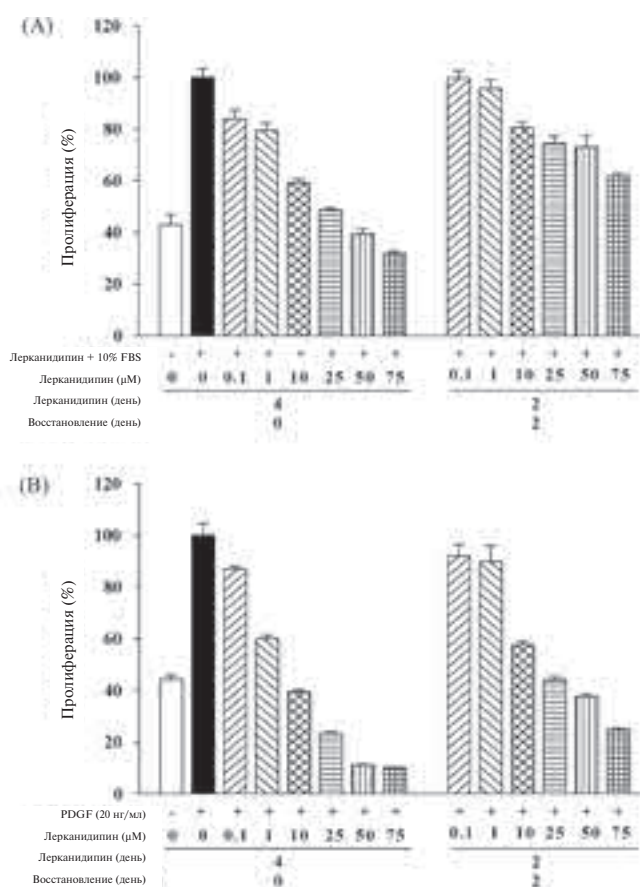


Рис. 3. Эффект лерканидипина на вызываемую FBS и PDGF-BB пролиферацию ГМЦС крысы. Неактивные клетки культивировались с добавлением 10% FBS (А) либо DMEM/1% FBS и PDGF-BB (В), в присутствии указанных концентраций лерканидипина, в течение 48 ч. Затем клетки промывались и культивировались в среде с добавлением 10% FBS либо DMEM/1% FBS и PDGF-BB, в присутствии лерканидипина либо без него, в течение дополнительных 48 ч. Жизнеспособность клеток оценивалась на 4-ый день, с помощью анализа ХТТ. Результаты, полученные в трех дублирующих экспериментах, были объединены и представлены в виде средних величин ± СОС.

сонных артерий промывались физиологическим раствором, осторожно отделялись от окружающих тканей, мгновенно замораживались и сохранялись при температуре -70°C для Вестерн-блот анализа (Western blot).

2.3. Клеточная культура

ГМЦС изолировались из грудного отдела аорты крыс-самцов линии Wistar, в возрасте 10-12 недель, по ранее описанной методике [13,14]. Клетки культивировались в среде DMEM, с добавлением 10% термически инактивированной FBS, 100 Ед/мл пенициллина и 100 $\mu\text{г}/\text{мл}$ стрептомицина, при температуре 37°C и 5% концентрации CO_2 в условиях инкубатора с влажной атмосферой. Чистота культур ГМЦС была подтверждена иммуноцитохимической локализацией α -актина гладких миоцитов. При достижении культурами насыщения они раз-

делялись с использованием 0,5% (w/v) трипсина. Среда менялась каждые 5 дней, и в экспериментах использовались 3-6-ой пассажи.

2.4. Анализ клеточной пролиферации

Анализ ХТТ и анализ с 5-бromo-2'-деоксиуридином (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) были выполнены по ранее описанной методике [13]. После синхронизации ГМЦС путем депривации сыворотки в течение 48 ч, клетки инкубировались с 10% FBS или 20 $\text{нг}/\text{мл}$ PDGF-BB на протяжении 24 или 48 ч, с добавлением лерканидипина либо без него. После периода инкубации в каждую лунку добавлялась BrdU-меченая смесь, и культуры инкубировались при 37°C в течение 6 ч. Подсчет окончательного числа клеток производился путем инкорпорации BrdU, с помощью метода ELISA для клеточной пролиферации (Roche Molecular Biochemicals, Germany). Тест ХТТ, измеряющий метаболическую активность и являющийся прямым маркером клеточной пролиферации, выполнялся в соответствии с инструкцией фирмы-производителя (Roche Molecular Biochemicals, Germany). Для экспериментального изучения процессов восстановления клетки обрабатывались, как указано выше, в течение 2 дней, с последующим культивированием без лерканидипина на протяжении дополнительных 2 дней.

2.5. Анализ заживления повреждения

Клетки помещались в 12-луночные планшеты для клеточных культур вместе с содержащей FBS средой. После достижения клеточной культурой периода полунасыщения, производилась замена клеточной среды на не содержащую FBS. Кончик пластиковой пипетки проводился по центру планшеты, с целью моделирования стерильного участка повреждения, через 24 ч после удаления сыворотки из клеточной среды. Спустя 24 ч после повреждения выполнялось многократное фотографирование зоны повреждения, в среде без сыворотки (контроль) и в присутствии 10% FBS и 20 $\text{нг}/\text{мл}$ PDGF-BB. Эффект лерканидипина анализировался путем добавления препарата к клеточной среде за 1 ч перед добавлением FBS либо PDGF-BB. Сравнительный анализ основывался на измерении миграционного расстояния между передним краем мигрирующих клеток и границей области повреждения.

2.6. Анализ в камере Бойдена

Миграция ГМЦС оценивалась с использованием транслучных полиэтилен-терефталатовых вкладышей с 8- $\mu\text{м}$ порами, по ранее описанной нами методике [13,14]. FBS (10%) и PDGF-BB (20 $\text{нг}/\text{мл}$) растворялись в DMEM и помещались

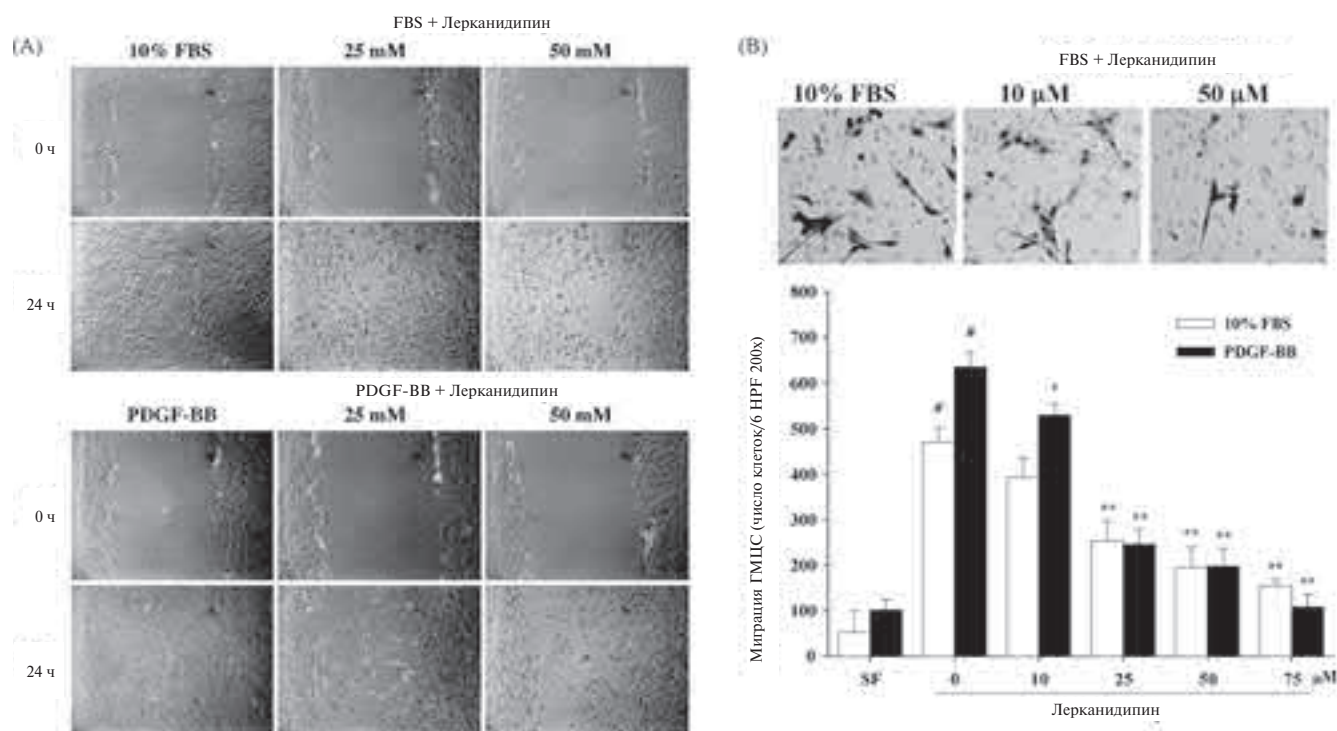


Рис. 4. Подавляющие эффекты лерканидипина на стимулируемую FBS и PDGF-BB подвижность и миграцию ГМЦС: закрытие раны и транслюочный анализ. (А) Закрытие раны, вызываемое FBS либо PDGF-BB, через 0 ч и 24 ч после баллонного повреждения, в присутствии лерканидипина (25 и 50 μM) либо без него. (В) Клетки предварительно обрабатывались лерканидипином в течение 1 ч, после чего к клеточной среде добавлялись 10% FBS или 20 нг/мл PDGF-BB, в течение дополнительных 24 ч. Окрашенные по Гимзе клетки подсчитывались под микроскопом (200 \times). Результаты, полученные в трех парах дублирующих экспериментов, были объединены и представлены в виде средних величин \pm СОС. # $P < 0,01$ по сравнению с группой без добавления сыворотки (serum-free, SF); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с клетками, обработанными FBS либо PDGF-BB.

в нижний отдел лунки, в присутствии лерканидипина (10–75 μM) либо без него. Затем ГМЦС (2×10^4 клеток) помещались в верхний отдел лунки и инкубировались в течение 24 ч при температуре 37 $^\circ\text{C}$ и соотношении концентраций CO_2 и воздуха 5% / 95%. Клетки на верхней поверхности мембраны удалялись, а клетки на нижней ее поверхности фиксировались метанолом и окрашивались по Гимзе. Определялось число клеток на 6 полей высокого разрешения (high-power fields; 200 \times HPF), и средние значения использовались для расчета миграционной активности клеток.

2.7. Анализ Вестерн-блот

После 48 ч покоя ГМЦС инкубировались в присутствии лерканидипина либо без него в течение 1 ч, затем стимулировались путем добавления 10% FBS (10 мин), либо 20 нг/мл PDGF-BB (20 мин). Реакции прекращались путем двойного промывания холодным PBS, с последующим забором клеток. Вестерн-блот использовался для выявления активной GTP-связывающей формы Ras, с помощью глутатион-S-трансферазы (glutathione S-transferase, GST) связывающего протеина, соответствующего Ras-связывающему домену (Ras-binding domain, RBD) Raf-1 на глутатион-агарозной основе, согласно про-

токолу компании-производителя (Upstate Biotechnology). Мембраны PVDF инкубировались с 1:1000 разведением антител к Ras, MAP киназе 1/2 (ERK 1/2), фосфор-MAP киназе, фосфор-MEK 1/2, фосфор-PDGFR- β , PCNA, фосфор-Akt, фосфор-STAT3 и β -актину. Артериальные ткани гомогенизировались в ледяном буфере и подвергались ультразвуковой обработке, с последующим выполнением электрофореза в 10% SDS-полиакриламидном геле. После инкубации вместе с соответствующими вторичными антителами, блоты инкубировались с реагентами ECL и проявлялись на фотопленке, для определения экспрессии протеинов [13,14].

2.8. Анализ клеточного цикла с помощью поточной цитометрии

ГМЦС синхронизировались в G_0 -фазе с помощью депривации сыворотки на протяжении 48 ч. После добавления свежей DMEM клетки инкубировались с различными концентрациями лерканидипина (1–100 μM), после чего, для стимулирования прогрессирования клеточного цикла, добавлялась 10% FBS. Через 48 ч клетки обрабатывались трипсином, центрифугировались при 1250 g в течение 5 мин, дважды промывались холодным PBS и обрабатывались РНазой А (RNase A) (10 $\mu\text{g}/\text{мл}$). ДНК окрашивалась

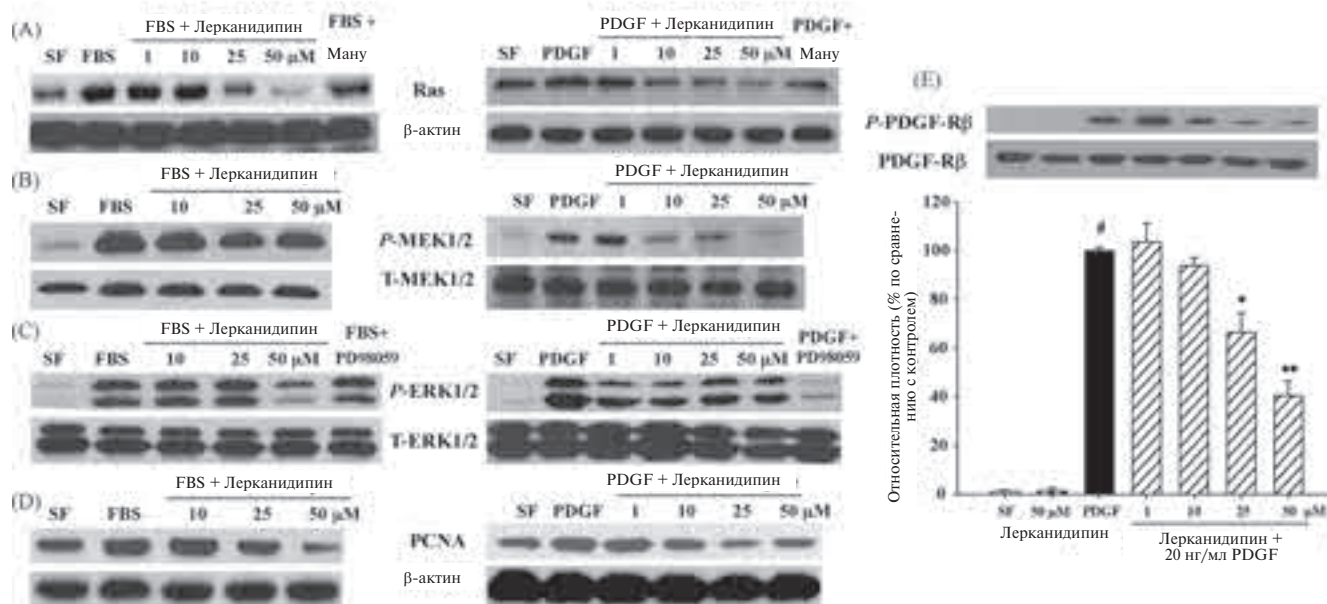


Рис. 5. Подавляющие эффекты лерканидипина на активацию Ras (A), MEK1/2 (B), ERK1/2 (C), PCNA (D) и PDGF-Rβ (E) в стимулируемых FBS и PDGF-BB ГМЦС. (А–С и Е) После депривации сыворотки ГМЦС культивировались в присутствии лерканидипина (1–50 μM), манумицина А (Ману; 1 μM) и PD98059 (40 μM), либо без этих веществ, в течение 1 ч, с последующей стимуляцией 10% FBS (10 мин) либо 20 нг/мл PDGF-BB (20 мин). (D) Неактивные клетки обрабатывались лерканидипином в течение 1 ч, с последующим добавлением 10% FBS либо PDGF-BB и инкубацией в течение 48 ч. Относительная активность измерялась путем скан-денситометрии; результаты, полученные в 3–5 независимых экспериментах, представлены в виде средних величин ± СОС. SF: ГМЦС помещались в среду без сыворотки (serum-free, SF). #P<0,01 по сравнению с SF; *P<0,05, **P<0,01 по сравнению с PDGF-BB.

пропидиум йодидом (50 μг/мл) в течение 30 мин при 37 °С, затем 5×10³ клеток анализировались методом поточной цитометрии [13,14].

2.9. Выявление внутриклеточных активных форм кислорода

Активные формы кислорода (reactive oxygen species, ROS) определялись по ранее описанной методике [13]. ГМЦС (1×10⁵ клеток) инкубировались с 20 нг/мл PDGF-BB в присутствии лерканидипина (1 μM) либо без него, в течение 6 ч. Для оценки индуцируемого PDGF-BB образования ROS клетки окрашивались 10 μM DCFHDA в течение 30 мин при 37 °С, отделялись с помощью трипсина/ЭДТА (EDTA), промывались, вновь суспензировались в PBS и затем немедленно анализировались методом поточной цитометрии. Поточный цитометр FACScan использовался для оценки определения ROS по интенсивности флюоресценции (FL-1, 525 нм) 10,000 клеток.

2.10. Статистический анализ

Данные представлены в виде средних величин ± стандартных ошибок средних величин (СОС). Статистическая достоверность различий оценивалась с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) либо непарных двусторонних t-тестов; при значении P<0,05 различия считались статистически достоверными.

3. Результаты

3.1. Лерканидипин подавлял образование неоинтимы и фосфорилирование ERK1/2 in vivo

Участки сонных артерий крыс контрольной группы и группы лерканидипина (3 и 10 мг/кг), у которых было выполнено баллонное повреждение, представлены на рис. 1А. Морфологический анализ показал, что образование неоинтимы было менее выраженным в группе лерканидипина, по сравнению с группой контроля. На основании расчета отношения интимамедия (И/М), терапия лерканидипином приводила к достоверному подавлению образования неоинтимы. Отношение И/М снижалось с 2,3±0,2 до 1,3±0,3 (p<0,05) и 0,9±0,1 (p<0,01) у животных, получавших 3 и 10 мг/кг лерканидипина, соответственно (рис. 1В).

Для изучения механизмов, лежащих в основе антипролиферативного эффекта лерканидипина, активация ERK1/2 оценивалась через 14 дней после баллонного повреждения. Фосфорилированная ERK1/2 обнаруживалась в сонных артериях, подвергшихся баллонному повреждению. У животных, получавших лерканидипин (3 и 10 мг/кг перорально), фосфорилирование ERK1/2 было достоверно снижено (рис. 1С).

3.2. Лерканидипин подавлял стимулируемую FBS и PDGF-BB пролиферацию ГМЦС

Через 24 и 48 ч инкубации рост аортальных ГМЦС крысы достоверно увеличивался после обработки 20 нг/

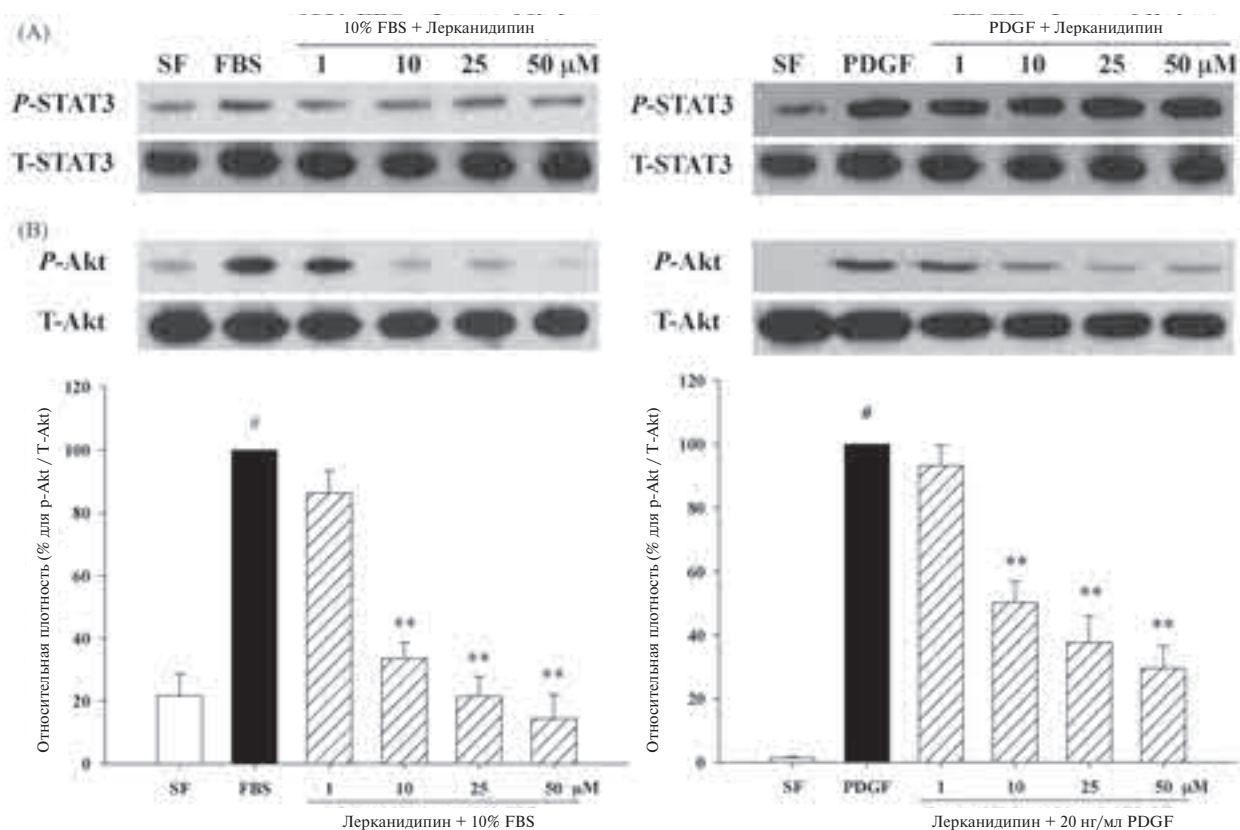


Рис. 6. Эффекты лерканидипина на активацию STAT3 (A) и Akt (B) в стимулируемых FBS и PDGF-BB ГМЦС. После депривации сыворотки ГМЦС культивировались в присутствии (1–50 μM) лерканидипина либо без него в течение 1 ч, с последующей стимуляцией 10% FBS или 20 нг/мл PDGF-BB в течение 20 мин. Относительная активность оценивалась с помощью денситометрии. Результаты, полученные в 4–5 независимых экспериментах, представлены в виде средних величин ± СОС. SF: ГМЦС помещались в среду без сыворотки (serum-free, SF). #p<0,01 по сравнению с SF; *p<0,05, **p<0,01 по сравнению с FBS либо PDGF-BB.

мл PDGF-BB либо 10% FBS, по сравнению с группой контроля (без добавления сыворотки). Как показано на рис. 2А и 2В, лерканидипин подавлял FBS- и PDGF-BB-стимулируемое увеличение числа клеток в прямой зависимости от концентрации и времени действия. Следует отметить, что лерканидипин начинал подавлять индуцируемую FBS и PDGF-BB пролиферацию ГМЦС при концентрациях 10 μM и 1 μM, соответственно. Это позволяет предположить, что ингибирующий эффект лерканидипина был более селективен по отношению к клеткам, обработанным PDGF-BB, по сравнению с FBS. Анализ с инкорпорацией BrdU выявил аналогичный характер подавления пролиферации ГМЦС крысы (рис. 2С и 2D).

Для оценки потенциальной обратимости подавляющего эффекта лерканидипина на пролиферацию ГМЦС, препарат добавлялся к двум культурам ГМЦС (0,1–75 μM), с последующей 48-часовой инкубацией. Затем лерканидипин удалялся из одной культуры и сохранялся в другой культуре на протяжении дополнительных 48 ч. Пролiferация клеток оценивалась на 4-ый день. Как показано на рис. 3, подавляющий эффект лерканидипина был обратимым, поскольку после удаления препарата из культуры пролиферация клеток возобновлялась.

Полученные результаты также свидетельствуют об отсутствии цитотоксического влияния лерканидипина на ГМЦС.

3.3. Лерканидипин подавлял индуцируемую FBS и PDGF-BB подвижность и миграцию клеток

После нанесения стерильного повреждения необработанные ГМЦС крысы мигрировали через край зоны повреждения, с последующим заполнением последней. Обработка 10% FBS и 20 нг/мл PDGF-BB приводила к временно-зависимой стимуляции миграции ГМЦС и ускорению времени заполнения области повреждения. При 24-часовом непрерывном воздействии лерканидипин (25 и 50 μM) подавлял стимулируемую FBS и PDGF подвижность ГМЦС (рис. 4А). Анализ в микрохемотаксической камере Бойдена продемонстрировал аналогичные результаты (рис. 4В). Двадцатичетырехчасовая обработка ГМЦС PDGF-BB и FBS увеличивала число мигрирующих клеток. При добавлении лерканидипина (10–75 μM) в нижний отдел камеры вместе с PDGF-BB либо 10% FBS, миграция клеток существенно уменьшалась, в прямой зависимости от концентрации препарата (рис. 4В).

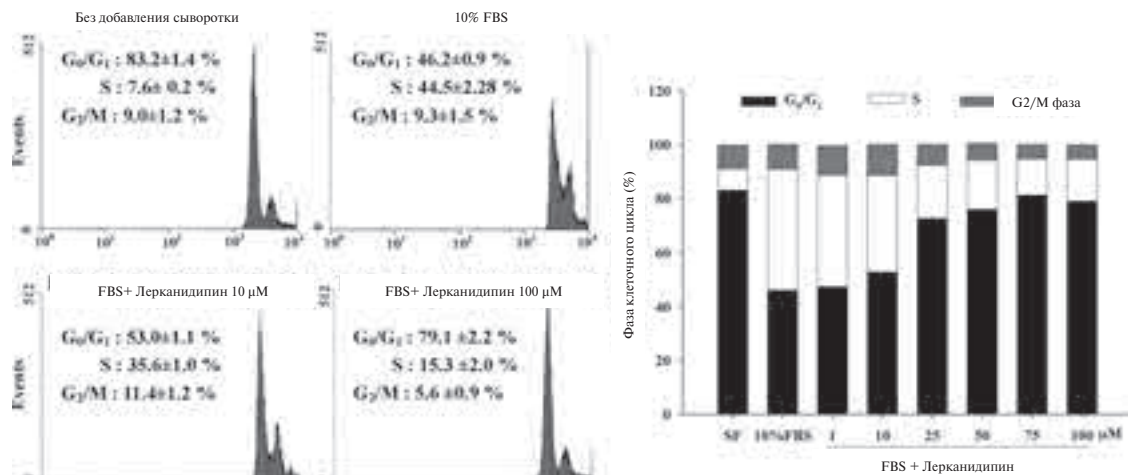


Рис. 7. Эффект лерканидипина на прогрессирование клеточного цикла. Лерканидипин дозозависимо подавлял переход ГМЦС в S-фазу клеточного цикла. Неактивные клетки обрабатывались лерканидипином (1–100 мМ) в течение 1 ч, с последующим добавлением 10% FBS и инкубацией в течение 24 ч. Результаты, полученные в 3 независимых экспериментах, представлены в виде средних величин ± СОС.

3.4. Антипролиферативный эффект лерканидипина был обусловлен подавлением механизмов Ras/MEK/ERK

Для изучения механизмов подавляющего действия лерканидипина на FBS- и PDGF-BB-индуцируемую клеточную пролиферацию, активность Ras оценивалась путем измерения количества Ras, преципитируемой под действием Raf-1 (RBD)-GST. Как показано на рис.5А, стимуляция FBS и PDGF-BB вызывала быструю активацию Ras. В клетках, обработанных лерканидипином (25 и 50 мМ) и ингибитором Ras-фарнесилтрансферазы ману-мицином А (1 мМ), стимулируемая FBS и PDGF-BB активация Ras достоверно подавлялась.

Дополнительно были изучены эффекты лерканидипина на фосфорилирование MEK1/2 и “дистальной” киназы Ras ERK1/2 в ГМЦС. Лерканидипин (25 и 50 мМ) снижал уровни фосфорилированной MEK1/2 при стимуляции как FBS, так и PDGF-BB (рис.5В). Полученные данные свидетельствуют о том, что FBS и PDGF-BB достоверно усиливают активацию ERK1/2 (рис. 5С). Как лерканидипин, так и селективный ингибитор MEK PD98059 (40 мМ) достоверно подавляли FBS- и PDGF-BB-индуцируемое фосфорилирование MEK1/2 и ERK1/2. В то же время, протеиновые уровни ERK1/2 не менялись при воздействии лерканидипина либо PD98059 (рис. 5С).

3.5. Лерканидипин подавлял экспрессию PCNA в ГМЦС, стимулируемых FBS и PDGF-BB

Экспрессия PCNA оценивалась с целью изучения антипролиферативного эффекта лерканидипина на уровне ядерных сигнальных механизмов. Как показано на рис.5D, индуцируемая FBS и PDGF-BB экспрессия PCNA достоверно подавлялась лерканидипином. Предварительная обработка лерканидипином статистически значимо уменьшала экспрессию PCNA, стимулируемую FBS (-15,2% и - 47,8% при концентра-

ции лерканидипина 25 и 50 мМ, соответственно). Индуцируемая PDGF экспрессия PCNA достоверно подавлялась лерканидипином в прямой зависимости от концентрации препарата (-24,0%, -39,1% и -36,2% при концентрациях 10, 25 и 50 мМ, соответственно).

3.6. Лерканидипин подавлял фосфорилирование PDGF-Rβ тирозинкиназы в стимулируемых PDGF-BB ГМЦС

Лерканидипин оказывал подавляющий эффект на “дистальные” компоненты действия PDGF-BB, такие как Ras, MEK1/2 и ERK1/2. Фосфорилирование PDGF-Rβ (начальный этап сигнального механизма PDGF-BB) оценивалось для того, чтобы определить, является ли оно непосредственной мишенью для действия лерканидипина и, таким образом, ключевым звеном в подавлении пролиферации ГМЦС. Как показано на рис.5Е, предварительная обработка лерканидипином достоверно и дозозависимо подавляла фосфорилирование PDGF-Rβ, вызываемое PDGF-BB (-6,2%, -33,5% и -59,5% при соответствующих концентрациях препарата 10, 25 и 50 мМ). Протеиновые уровни PDGF-Rβ достоверно не менялись при относительно коротком воздействии лерканидипина (рис. 5Е).

3.7. Эффект лерканидипина на фосфорилирование Akt и STAT3

Поскольку механизмы PI3K-Akt и Jak-STAT также участвуют в регуляции индуцируемой PDGF-BB клеточной миграции и пролиферации ГМЦС, эффект лерканидипина на активацию этих механизмов изучался в клетках, стимулируемых FBS и PDGF-BB. Как 10% FBS, так и PDGF-BB вызывали существенное усиление активации Akt и STAT3. Лерканидипин не влиял на активацию STAT3

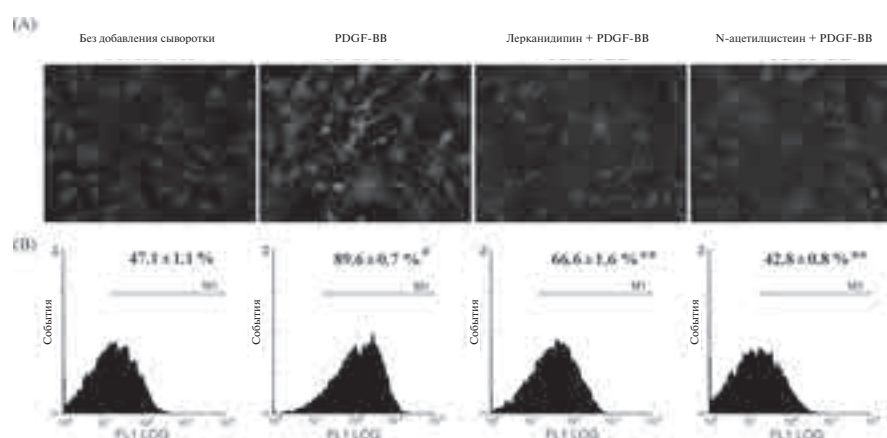


Рис. 8. Лерканидипин подавлял вызываемую PDGF-BB продукцию ROS. (А) Микроскопическая картина образования DCF после генерации ROS (исходное увеличение 200×). ГМЦС обрабатывались лерканидипином (1 μ) либо N-ацетилцистеином (5 мМ) в течение 1 ч, с последующим добавлением PDGF-BB (20 нг/мл) в течение дополнительных 6 ч. (В) Внутриклеточный уровень перекиси водорода определялся с помощью поточно-цитометрического анализа DCFH-DA. Определялись значения параметра M1 (доля клеток в %) для различных режимов инкубации. Результаты, полученные в 4-5 независимых экспериментах, представлены в виде средних величин ± СОС. FL1-H: интенсивность DCF-флюоресценции ГМЦС. #p<0,01 по сравнению с SF; **p<0,01 по сравнению с PDGF-BB.

в ГМЦС, стимулируемых FBS и PDGF-BB (рис.6А). В то же время, фосфорилирование Akt, стимулируемое FBS и PDGF-BB, достоверно и дозозависимо подавлялось лерканидипином (рис.6В). Достоверное уменьшение фосфорилирования Akt наблюдалось при концентрации лерканидипина 10 μМ.

3.8. Лерканидипин останавливал стимулируемый FBS клеточный цикл в фазе G1

Прогрессирование клеточного цикла исходно неактивных клеток после стимуляции 10% FBS и эффекты лерканидипина (1–100 μМ) показаны на рис.7. В данном исследовании 83,2±1,4% клеток останавливались в фазе G0/G1 цикла, после инактивации клеток путем депривации сыворотки. Доля клеток в S-фазе достоверно возрастала с 7,6±0,2% до 44,5±2,2% (p<0,001) через 48 ч после депривации сыворотки. У обработанных лерканидипином клеток, напротив, отмечалось подавление прогрессирования клеточного цикла, в прямой зависимости от концентрации препарата. Лерканидипин вызывал увеличение числа ГМЦС в G0/G1-фазе цикла, с одновременным уменьшением числа клеток в S-фазе. Под действием лерканидипина ГМЦС не вступали в S-фазу клеточного цикла (рис. 7).

3.9. Подавляющий эффект лерканидипина на внутриклеточное образование ROS

Увеличение интенсивности внутриклеточной флюоресценции в обработанных PDGF-BB ГМЦС подавлялось лерканидипином и N-ацетилцистеином (рис.8А). Как показано на рис.8В, обработка PDGF-BB достоверно усиливала внутриклеточное образование перекиси водорода; при этом доля ГМЦС с избыточной экспрессией ROS (M1) достигала 89,6±0,7%. Лерканидипин демонстрировал статистически значимое подавление продукции ROS, индуцируемой PDGF-

BB; величина M1 при концентрации лерканидипина 1 μМ достигала 66,6±1,6%. N-ацетилцистеин снижал индуцируемую PDGF-BB внутриклеточную продукцию перекиси водорода до контрольного уровня, что использовалось в качестве положительного контроля.

4. Обсуждение

Точные механизмы подавляющего действия лерканидипина на ГМЦС, стимулируемые сывороткой и фактором роста, остаются недостаточно изученными. В данном исследовании впервые было показано, что лерканидипин уменьшает гиперплазию неоинтимы после ангиопластики, подавляя пролиферацию и миграцию ГМЦС за счет влияния на сигнальные механизмы Ras/MEK/ERK и PI3K/Akt, а также внутриклеточное образование ROS.

Ранний рестеноз артерии после ЧТКА является основным фактором, ограничивающим терапевтическую эффективность данного вмешательства. Рестеноз преимущественно обусловлен накоплением гладких миоцитов в стенке артерии, в области баллонного повреждения. Таким образом, ограничение пролиферации ГМЦС имеет важное терапевтическое значение [1,5]. В данном исследовании было продемонстрировано, что пероральный прием лерканидипина приводит к достоверному уменьшению образования неоинтимы через 14 дней после повреждения артерии. Отношение интима-медия в образцах артерий, взятых у животных, которые получали лерканидипин, было достоверно ниже, чем в контрольных образцах (рис. 1). Проллиферация и миграция ГМЦС играют важную роль в формировании неоинтимы после баллонного повреждения. После адгезии к поврежденной стенке сосуда тромбоциты выделяют PDGF, что может являться основным стимулом для миграции и пролиферации гладких миоцитов [6,7].

Нами было показано, что лерканидипин уменьшает стимулируемую FBS и PDGF-BB пролиферацию и миграцию ГМЦС, и что ингибирующее действие лерканидипина на пролиферацию ГМЦС обратимо (рис. 2 и 4). Это свидетельствует об отсутствии цитотоксического эффекта лерканидипина на ГМЦС. По данным множества исследований с использованием экспериментальных моделей атеросклероза, а также клинических испытаний, дигидропиридиновые антагонисты кальция обладают антиатеросклеротическим действием [2–5]. Таким образом, лерканидипин может рассматриваться в качестве перспективного препарата для профилактики сосудистых осложнений, включая рестеноз после ЧТКА.

Хорошо известно, что связывание PDGF-BB с PDGF-рецепторами приводит к фосфорилированию PDGF-R β тирозиновых остатков. Связывание PDGF с его основным, тирозин-киназным рецептором стимулирует целый ряд процессов, в том числе активацию сигнальных механизмов PI3-киназы/Akt, Jak/STAT, Ras-Raf-ERK1/2, а также фосфолипазы C γ [15–17]. Результаты данного исследования показали, что лерканидипин действует за счет подавления стимулированной PDGF-BB активации PDGF-R β тирозин-киназы. Митогены, такие как FBS и PDGF-BB, усиливают экспрессию фосфорилированных MEK1/2 и ERK1/2 [15,16], в то время как активация и экспрессия Ras, MEK1/2 и ERK1/2 уменьшается при предварительной обработке ГМЦС лерканидипином (рис. 5). В сонных артериях, подвергшихся баллонному повреждению, увеличивалась сигнальная активность MAPK, особенно за счет ERK1/2; репликация клеток меди после повреждения уменьшалась под действием PD98059 [4,16]. Нами также было показано, что у крыс пероральное назначение лерканидипина предотвращает вызываемое баллонным повреждением фосфорилирование ERK1/2. Это свидетельствует о том, что вызываемое лерканидипином подавление пролиферации ГМЦС и клеточной миграции обусловлено ингибированием сигнального механизма Ras-Raf-ERK1/2, за счет блокады PDGF-R β тирозиновых остатков. Сигнальные механизмы STAT3 и Akt также могут влиять на вызываемую PDGF клеточную миграцию и пролиферацию [17,18]. В нашем исследовании интенсивность фосфорилирования STAT3 и Akt киназы увеличивалась под действием PDGF-BB. При этом лерканидипин подавлял вызываемое PDGF-BB фосфорилирование Akt, но не STAT3. Таким образом, протеин Akt может являться потенциальной мишенью для действия лерканидипина (рис.). Akt (другие названия – PKB, Rac) влияет на выживание и рост клеток за счет фосфорилирования и инактивации про-апоптотических протеинов [19]. Следовательно, полученные результаты указывают на то, что механизм ERK1/2-MAPK, совместно с другими про-пролиферативными сигнальными

механизмами (например, PI3K/Akt), участвует в регуляции PDGF-зависимой пролиферации клеток.

Для изучения эффектов лерканидипина на регуляцию активности ГМЦС на ядерном уровне, были оценены уровни PCNA. PCNA синтезируется в начале G1 и S-фаз клеточного цикла и требуется для перехода от G1-фазы к S-фазе. Таким образом, PCNA может использоваться в качестве маркера клеточной пролиферации как в норме, так и в патологии [4,20]. В нашем исследовании было показано, что лерканидипин подавлял экспрессию PCNA и останавливал клетки в G0/G1-фазе. Это позволяет предположить, что лерканидипин ингибирует пролиферацию ГМЦС за счет раннего нарушения G0/G1-фазы клеточного цикла и блокады вступления клеток в S-фазу.

Предполагается, что ROS являются ключевыми сигнальными молекулами в целом ряде биологических процессов, таких как клеточная пролиферация. Последняя играет важную роль в утолщении интимы при атеросклерозе и рестенозе [12,21]. В нашем исследовании лерканидипин был сходен по своему действию с антиоксидантом N-ацетилцистеином, подавляя индуцируемую PDGF-BB продукцию ROS (рис.8). Как было продемонстрировано в ранее выполненных исследованиях, некоторые антагонисты кальция обладают антиоксидантной активностью и способны захватывать свободные радикалы и активные формы кислорода [10,11]. В частности, лерканидипин способен уменьшать внутриклеточное образование ROS. В ряде исследований было показано, что стимуляция ГМЦС с помощью PDGF-BB вызывает усиление внутриклеточной продукции ROS и активирует ERK1/2 [15,16,21], что, в свою очередь, подавляется N-ацетилцистеином [21]. В совокупности, эти данные представляют собой солидную доказательную базу, поддерживающую гипотезу о том, что ингибирующее действие лерканидипина на пролиферацию и миграцию ГМЦС обусловлено способностью препарата подавлять активацию ERK1/2, за счет уменьшения стимулированной PDGF-BB продукции ROS.

Таким образом, представленные в данной статье результаты демонстрируют, что лерканидипин ингибирует пролиферацию и миграцию ГМЦС *in vitro*, а также уменьшает образование неоинтимы *in vivo*, при сосудистом повреждении после баллонной ангиопластики. Было показано, что лерканидипин подавляет пролиферацию ГМЦС за счет ингибирования механизмов Ras-MEK1/2-ERK1/2, PI3K/Akt и внутриклеточного образования ROS, а также остановки клеточного цикла ГМЦС в G0/G1-фазе. Лерканидипин обладает важным терапевтическим потенциалом, который в будущем, при условии проведения дополнительных исследований, может быть использован для профилактики рестеноза после коронарной ангиопластики, стентирования и аортокоронарного шунтирования.

Литература

1. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115–26.
2. Corsini A, Bonfatti M, Quarato P, Accomazzo MR, Raiteri M, Sartani A, et al. Effect of the new calcium antagonist lercanidipine and its enantiomers on the migration and proliferation of arterial myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:687–94.
3. Corsini A, Accomazzo MR, Canavesi M, Sartani A, Testa R, Catapano AL, et al. The new calcium antagonist lercanidipine and its enantiomers affect major processes of atherogenesis in vitro: is calcium entry involved? *Blood Press Suppl* 1998;2:18–22.
4. Hirata A, Igarashi M, Yamaguchi H, Suwabe A, Daimon M, Kato T, et al. Nifedipine suppresses neointimal thickening by its inhibitory effect on vascular smooth muscle cell growth via a MEK-ERK pathway coupling with Pyk2. *Br J Pharmacol* 2000;131:1521–30.
5. Zanchetti A, Bond MG, Hennig M, Neiss A, Mancina G, Dal Palu C, et al. Calcium antagonist lacidipine slows down progression of asymptomatic carotid atherosclerosis: principal results of the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA), a randomized, double-blind, long-term trial. *Circulation* 2002;106:2422–7.
6. Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine & Growth Factor Rev* 2004;15:237–54.
7. Millette E, Rauch BH, Kenagy RD, Daum G, Clowes AW. Platelet-derived growth factor-BB transactivates the fibroblast growth factor receptor to induce proliferation in human smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med* 2006;16: 25–8.
8. Chen XL, Chen ZS, Ding Z, Dong C, Guo H, Gong NQ. Antisense extracellular signal-regulated kinase-2 gene therapy inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation, migration and transforming growth factor-beta (1) expression in vascular smooth muscle cells and attenuates transplant vasculopathy. *Transpl Int* 2008;21:30–8.
9. Guarneri L, Sironi G, Angelico P, Ibba M, Greto L, Colombo D, et al. In vitro and in vivo vascular selectivity of lercanidipine and its enantiomers. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;29: S25–32.
10. Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, Pastorino AM, Davoli A, Nava C, et al. Antioxidant activity of different dihydropyridines. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302:679–84.
11. Ram CV. Hypertension, possible vascular protection and lercanidipine. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006;4:783–8.
12. Sasaki T, Maruyama H, Kase Y, Takeda S, Aburada M. Antianginal effects of lercanidipine on the vasopressin or methacholine induced anginal model in rats. *Biol Pharm Bull* 2005;28:811–6.
13. Yeh JL, Liou SF, Chang YP, Lin SW, Liu TS, Wu BN, et al. Isoeugenodilol inhibits smooth muscle cell proliferation and neointimal thickening after balloon injury via inactivation of ERK1/2 pathway. *J Biomed Sci* 2008;15:375–89.
14. Liou SF, Yeh JL, Liang JC, Chiu CC, Lin YT, Chen JJ. Inhibition of mitogen-mediated proliferation of rat vascular smooth muscle cells by labedipinedilol-A through PKC and ERK 1/2 pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:539–51.
15. Koyama H, Olson NE, Dastvan FF, Reidy MA. Cell replication in the arterial wall: activation of signaling pathway following in vivo injury. *Circ Res* 1998;82:713–21.
16. Kim TJ, Jeon J, Jin YR, Son DJ, Yoo HS, Hong JT, et al. Effects of KTJ740, a novel antithrombotic agent, on platelet-derived growth factor-induced rat aortic smooth muscle cell proliferation and cell cycle progression. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;49:280–6.
17. Chen Z, Lee FY, Bhalla KN, Wu J. Potent inhibition of platelet-derived growth factor-induced responses in vascular smooth muscle cells by BMS-354825 (dasatinib). *Mol Pharmacol* 2006;69:1527–33.
18. Li L, Blumenthal DK, Masaki T, Terry CM, Cheung AK. Differential effects of imatinib on PDGF-induced proliferation and PDGF receptor signaling in human arterial and venous smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 2006;99:1553–63.
19. Seo JM, Kim TJ, Jin YR, Han HJ, Ryu CK, Sheen YY, Kim DW, Yun YP. YSK2821, a newly synthesized indole derivative, inhibits cell proliferation and cell cycle progression via the cell cycle-related proteins by regulating phosphatidylinositol-3 kinase cascade in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 2008;586:74–81.
20. Ranganna K, Yatsu FM, Hayes BE, Milton SG, Jayakumar A. Butyrate inhibits proliferation-induced proliferating cell nuclear antigen expression (PCNA) in rat vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* 2000;205: 149–61.
21. Park J, Ha H, Seo J, Kim MS, Kim HJ, Huh KH, et al. Mycophenolic acid inhibits platelet-derived growth factor-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Transpl* 2004;4:1982–90.

Abstract

Lercanidipine, a calcium channel antagonist, is currently employed in the treatment of essential hypertension and angina pectoris. The purpose of this study was to elucidate the anti-proliferative effect of lercanidipine and to investigate the molecular role of this agent. Both in vitro studies and in a balloon injury rat carotid artery model were employed to study the effect of lercanidipine on smooth muscle cell proliferation. Lercanidipine-inhibited rat vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and migration in a dose-dependent manner following stimulation of VSMC cultures with 10% fetal bovine serum (FBS) and 20 ng/ml platelet-derived growth factor (PDGF)-BB. FBS- and PDGF-BB-stimulated intracellular Ras, MEK1/2, ERK1/2, proliferative cell nuclear antigen (PCNA), and Akt activations were significantly inhibited by lercanidipine; however, lercanidipine did not affect FBS- and PDGF-BB-induced STAT3 phosphorylation.

Lercanidipine also inhibited PDGF-receptor β chain phosphorylation and reactive oxygen species (ROS) production induced by PDGF-BB. Lercanidipine blocked the FBS-inducible progression through the G0/G1 to the S-phase of the cell cycle in synchronized cells. In vivo, 14 days after balloon injury, treatment with 3 and 10 mg/kg lercanidipine resulted in significant inhibition of the neointima/media ratio.

Suppression of neointima formation by lercanidipine was dependent on its influence on ERK1/2 phosphorylation. These results demonstrate that lercanidipine can suppress the proliferation of VSMCs via inhibiting cellular ROS, Ras-MEK1/2-ERK1/2, and PI3K-Akt pathways, and suggesting that it may have therapeutic relevance in the prevention of human restenosis.

Keywords: Lercanidipine, vascular smooth muscle cells, platelet-derived growth factor, MAP kinase, reactive oxygen species.

Поступила 24/05 – 2010