

- chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153: 967–975.
7. *Enright P.L., Sherrill D.L.* Reference equations for the six-minute walk in healthy adults. *Ibid.* 1998; 158 (5, Pt 1): 1384–1387.
  8. *Filuk R.B., Easton P.A., Anthonisen N.R.* Response to large dose of salbutamol and theophylline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1985; 132: 871–874.
  9. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease NHLBI/WHO Workshop report. – NIH Publication 2701, April 2001. 1–100.
  10. *Guyatt G.H., Sullivan M.J., Thompson P.J.* The 6-min walk: a new measure of exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Can. Med. Assoc. J.* 1985; 132: 919–923.
  11. *Guyatt G.H., Townsend M., Pugsley S.O.* Bronchodilators in chronic air-flow limitation effects on airway function exercise capacity and quality of life. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 135: 1069–1074.
  12. *Hyatt R.E.* The interrelationship of pressure flow and volume during various respiratory manoeuvres in normal and emphysematous patients. *Ibid.* 1961; 83: 676–683.
  13. *Koulounis N.G., Valta P., Lavoie A.* A simple method to detect expiratory flow limitation during spontaneous breathing. *Eur. Respir. J.* 1995; 306–313.
  14. *Nisar M., Hams J.E., Pearson M.G., Calverley P.M.A.* Acute bronchodilator trials in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 146: 555–559.
  15. *O'Donnell D.E., Lam M., Webb K.A.* Spirometric correlates of improvement in exercise performance after anticholinergic therapy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 160: 542–549.
  16. *O'Donnell D.E.* Assessment of bronchodilator efficacy in symptomatic COPD: is spirometry useful? *Chest* 2000; 117: 42–47.
  17. *O'Donnell D.E., Forkert L., Webb K.A.* Evaluation of bronchodilator responses in patients with "irreversible" emphysema. *Eur. Respir. J.* 2001; 18: 914–920.
  18. *Quanjer Ph. H., Tammelin G.J., Cotes J.E. et al.* Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party "Standardization of Lung Function Tests". European Coal and Steel Community. *Ibid.* 1993; 6 (suppl. 16): 5–40.
  19. *Tantucci C., Duguet A., Similowski T. et al.* Effect of salbutamol on dynamic hyperinflation in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Ibid.* 1998; 12: 799–804.

Поступила 23.09.02

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 616.248–085.234

*С.Н.Орлов<sup>1,2</sup>, Г.Г.Рязжский<sup>3</sup>, А.С.Соколов<sup>3</sup>, А.Г.Чучалин<sup>3</sup>*

## КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ: РОЛЬ ГЕНОМНЫХ И ВНЕГЕНОМНЫХ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ

<sup>1</sup> Научно-исследовательский центр университета г. Монреаль, Канада;

<sup>2</sup> Лаборатория физико-химии биомембран биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова;

<sup>3</sup> Институт пульмонологии Минздрава РФ, Москва

CELLULAR MECHANISMS OF DRUG INTERACTION IN BRONCHIAL ASTHMA THERAPY:  
A ROLE OF GENOMIC AND EXTRAGENOMIC SIGNALING SYSTEMS

*S.N.Orlov, G.G.Ryazhsky, A.S.Sokolov, A.G.Chuchalin*

### Summary

The present review discusses data on cellular mechanisms of interaction of beta-adrenergic agonists and glucocorticoids which are a basis of beneficial asthma therapy being inhaled in common. We show that besides inhibition of myosin light chains beta-agonists can influence the smooth muscle cells modulating the Ca<sup>2+</sup>-channels' activity due to cytoskeleton's proteins, and regulate the smooth muscle cell contraction independently on protein kinase A. Moreover, the beta-agonists are able to stimulate gene expression and to control the initiation of programme cell death (apoptosis) like steroid hormones do. In turn the steroids can be involved to the pathogenesis of bronchial asthma without the expression of genes controlling inflammatory reactions, while the beta-agonists effect the inflammation via production of extracellular cyclic AMP and adenosine.

### Резюме

В настоящей работе рассмотрены данные о клеточных механизмах взаимодействия агонистов β-адренергических рецепторов и глюкокортикоидов, которые составляют основу успешной терапии бронхиальной астмы, отмеченной при совместной ингаляции этих соединений. Мы приводим данные о том, что помимо ингибирования киназы легких цепей миозина β-агонисты могут влиять на гладкомышечные клетки (ГМК) через модуляцию активности Ca<sup>2+</sup>-каналов, опосредованную белками цитоскелета, и регулировать контрактуру ГМК вне зависимости от протеинкиназы А. Более того,

подобно стероидным гормонам  $\beta$ -агонисты способны вызывать экспрессию генов и контролировать развитие программируемой смерти клеток (апоптоза). В свою очередь стероидные гормоны могут быть вовлечены в патогенез бронхиальной астмы, минуя экспрессию генов, контролирующих протекание воспалительной реакции, в то время как  $\beta$ -агонисты оказывают влияние на формирование воспалительного процесса через генерацию внеклеточного цАМФ и аденозина.

Агонисты  $\beta$ -адренергических рецепторов и глюкокортикоидные гормоны остаются наиболее эффективным средством фармакологической коррекции нарушенной функции легких при бронхиальной астме [1,3]. Согласно общепринятым представлениям, в основе бронхорасширяющего действия агонистов  $\beta$ -адреноцепторов лежит активация цАМФ-зависимой протеинкиназы (РКА), которая путем фосфорилирования киназы легких цепей миозина в гладкомышечных клетках (ГМК) воздухопроводящих путей вызывает уменьшение чувствительности этого фермента к приросту внутриклеточной концентрации кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ), вызванной бронхоконстрикторами (рис.1) [1,2]. Терапевтический эффект кортикостероидов связывается с их взаимодействием с ядерными рецепторами, которые при димеризации активируют экспрессию генов, кодирующих IL-10 и другие противовоспалительные белки, а в состоянии мономера ингибируют активность факторов транскрипции (NF- $\kappa$ B, AP-1, NF-AT), контролирующих экспрессию цитокинов и других белков, вызывающих воспалительную реакцию [4,6].

Сравнительно недавно были проведены клинические испытания ингаляционной лекарственной формы комбинации  $\beta$ -агонистов долгосрочного действия (сальметерол, формотерол) и кортикостероидов (флутиказон, будесонид), которые показали высокую

эффективность у больных с бронхиальной астмой [26,34]. На основании результатов этих исследований было предположено, что в основе успеха сочетанной терапии лежит нечто большее, чем простая комбинация уже описанных механизмов действия этих соединений. В самом деле, было продемонстрировано, что кортикостероидные гормоны вызывают экспрессию  $\beta$ -адреноцепторов, что снижает их даун-регуляцию при долгосрочном введении  $\beta$ -агонистов, в то время как  $\beta$ -агонисты вызывают увеличение содержания рецепторов стероидных гормонов в ядерной фракции клеток, что способствует увеличению эффективности действия глюкокортикостероидов как факторов регуляции транскрипции [5].

Цель настоящего исследования — осветить возможные пути взаимодействия этих классов лекарственных препаратов в более широком аспекте. В этой связи мы рассмотрим данные, свидетельствующие о том, что  $\beta$ -агонисты могут влиять на сокращение ГМК вне зависимости от модуляции киназы легких цепей миозина и протеинкиназы А (РКА). Более того, подобно стероидным гормонам,  $\beta$ -агонисты могут влиять на экспрессию генов и контролировать развитие программируемой смерти клеток (апоптоза). В свою очередь стероидные гормоны способны влиять на патогенез бронхиальной астмы минуя экспрессию генов, контролирующих протекание воспалительной реакции, и напротив,  $\beta$ -агонисты могут быть вовлечены в формирование воспалительного процесса через генерацию внеклеточного цАМФ как предшественника аденозина.

### **$\beta$ -Агонисты ингибируют $Ca^{2+}$ -каналы ГМК через реорганизацию цитоскелета**

Развитие контрактуры ГМК определяется приростом концентрации внутриклеточного кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ), величина которого во многом зависит от активности систем, контролирующих скорость поступления этого катиона из внеклеточной среды, в том числе через потенциалзависимые  $Ca^{2+}$ -каналы (см. рис.1). Четверть века назад было установлено, что в кардиомиоцитах и клетках нервной ткани активация  $\beta$ -агонистами дигидропиридинчувствительных  $Ca^{2+}$  каналов L-типа связана с их фосфорилированием РКА [24]. Мы предприняли аналогичные исследования и установили, что в отличие от указанных выше клеток  $\beta$ -агонисты и другие активаторы цАМФ ингибируют потенциалзависимый дигидропиридин-чувствительный вход  $Ca^{2+}$  в ГМК сосудов [31].

При анализе возможных механизмов этого явления мы обратили внимание на то, что активация цАМФ в ГМК сопровождается резкой перестройкой

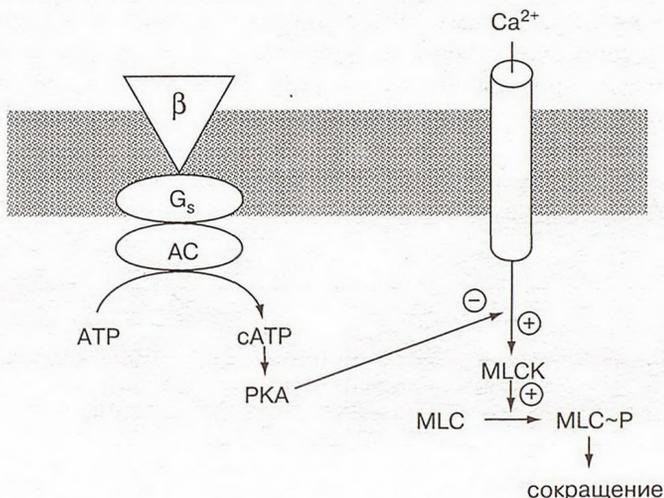


Рис.1. Общепринятый механизм расслабления ГМК агонистами  $\beta$ -адреноцепторов.

Активация аденилатциклазы (AC), происходящая при взаимодействии  $\beta$ -адреноцепторов ( $\beta$ ) с  $G_s$  ГТФ-связывающими белками, приводит к активации цАМФ-зависимой протеинкиназы (РКА) и фосфорилированию киназы легких цепей миозина (MLCK). Фосфорилирование MLCK снижает сродство этого фермента к  $[Ca^{2+}]_i$ , что и является непосредственной причиной уменьшения фосфорилирования легких цепей миозина (MLC) и снижения сокращения ГМК.

цитоскелета подобно той, которую вызывает дезинтегратор микрофиламентов цитохалазин В [32,33] (рис.2). Более того, в дальнейших исследованиях мы обнаружили, что цитохалазин В имитирует ингибирующий эффект цАМФ на активность  $Ca^{2+}$ -каналов, в то время как винбластин, соединение стабилизирующее микрофиламенты, устраняет действие цАМФ как на организацию цитоскелета в ГМК (см. рис.2), так и на активность  $Ca^{2+}$ -каналов (табл.1). На основании этих данных мы предположили, что  $\beta$ -агонисты вызывают ингибирование  $Ca^{2+}$ -каналов ГМК через реорганизацию цитоскелета [31]. Впоследствии этот вывод был подкреплен электрофизиологическими экспериментами [25].

### $\beta$ -Агонисты вызывают расслабление ГМК воздухопроводящих путей независимо от РКА

Синтез проникающих в клетку высокоселективных модуляторов РКА позволил приступить к исследованию роли этого фермента в регуляции сокращения ГМК [40]. Было установлено, что ингибитор этого фермента (Rp-8-СРТ-сАМПС) полностью устраняет расслабляющее действие активатора фосфодиэстеразы (зардаверина) и вазоактивного интестинального пептида (VIP) на ГМК, изолированные из трахеи морской свинки и предварительно обработанные ацетилхолином. Напротив, расслабляющий эффект агониста  $\beta$ -адреноцепторов (изопrenalина) не зависел от присутствия Rp-8-СРТ-сАМПС (табл.2). Необходимо отметить, что регуляторная субъединица РКА является единственным известным к настоящему времени функционально значимым рецептором цАМФ в клетках млекопитающих. В этой связи не исключена возможность того, что ни только РКА, но и прирост внутриклеточного содержания цАМФ, как результат активации аденилатциклазы, не вовлечены в расслабляющее действие агонистов  $\beta$ -адреноцепторов на ГМК воздухопроводящих путей. Эта гипотеза нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке.

### $\beta$ -Агонисты как модуляторы развития апоптоза

Программируемая смерть клеток, или апоптоз, занимает центральное место в развитии воспалительной реакции, которая протекает в легких при участии клеток крови (Т-лимфоцитов, нейтрофилов,

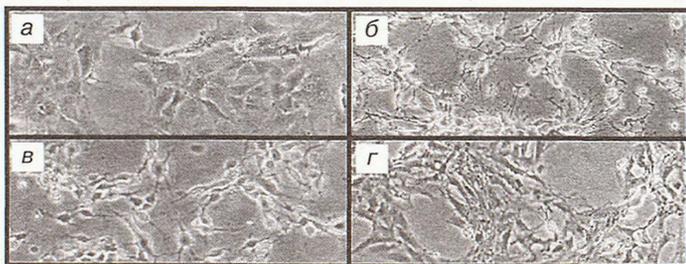


Рис.2. Фазово-контрастная микроскопия контрольных ГМК (а) и ГМК, обработанных в течение 20 мин активатором аденилатциклазы (форсколином) (б), цитохалазином В (в) и форсколином в присутствии винбластина (г).

Таблица 1

**Активность  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа в ГМК сосудов, измеренная как прирост скорости входа  $^{45}Ca$ , вызванного деполяризацией**

| Добавки в среду инкубации  | Активность $Ca^{2+}$ -каналов L-типа, пмоль (мг белка) $^{-1}$ 5 мин $^{-1}$ |
|----------------------------|--|
| Контроль                   | 465±51   |
| Изопротеренол              | 101±11   |
| Форсколин                  | 68±17  |
| Цитохалазин В              | 88±22  |
| Винбластин                 | 501±46   |
| Винбластин + изопротеренол | 467±33   |

эозинофилов), тучных клеток и макрофагов и затрагивает как клетки эпителия, так и находящиеся под их прикрытием ГМК воздухопроводящих путей [36,43,44]. Роль кортикостероидов как индукторов апоптоза в Т-лимфоцитах твердо установлена. Предполагается, что этот механизм запуска программируемой смерти наряду с регуляцией экспрессии про- и противовоспалительных пептидов вносит существенную роль в подавление воспалительной реакции глюкокортикоидами [18]. Значимость регуляции апоптоза стероидными гормонами становится особенно важной в связи с последними наблюдениями, отмечающими сниженную эффективность этого процесса у больных бронхиальной астмой в мононуклеарных клетках, включая изолированные эозинофилы [7,21]. Для эозинофилов стероидная терапия убыстряет протекание апоптоза [21]. Следует, однако, отметить, что в отличие от клеток иммунного ответа стероидная терапия способствует развитию апоптоза в клетках эпителия воздухопроводящих путей [13]. Роль кортикостероидов как модуляторов апоптоза ГМК остается малоизученной.

Данные о регуляции апоптоза системой цАМФ и  $\beta$ -адреноцепторами, в частности, относительно мало-

Таблица 2

**Расслабляющее действие  $\beta$ -агониста (изопrenalина) на ГМК воздухопроводящих путей не зависит от присутствия ингибитора РКА (Rp-8-СРТ-сАМПС) [40]**

| Добавки                   | Генерируемая контрактура, мг |                  |
|---------------------------|------------------------------|------------------|
|                           | контроль                     | + Rp-8-СРТ-сАМПС |
| Ацетилхолин               | 1,200±101                    | 1,056±189        |
| Ацетилхолин + зардаверин  | 102±41                       | 1088±202         |
| Ацетилхолин + VIP         | 211±29                       | 999±103          |
| Ацетилхолин + изопrenalин | 189±30                       | 156±17           |

численны и свидетельствуют о тканеспецифичном характере этого явления. Так, например, активация цАМФ-системы не влияла на развитие апоптоза в Т-лимфоцитах, обработанных дексаметазоном или *Fas*-лигандом [22,38], но подавляло развитие апоптоза в HL-60 клетках [20], нейтрофилах [35] и эозинофилах [8]. Наш интерес был сосредоточен на исследовании ГМК, полученных из аорты крысы и трансфицированных E1A аденовирусом. В этих клетках полное развитие апоптоза протекает через 6–10 ч после их перевода в среду, лишенную ростовых факторов, что делает эти клетки удобной моделью для скрининга про- и антиапоптотических соединений. Мы установили, что в этих клетках активация системы цАМФ различными агентами, включая  $\beta$ -агонисты, резко замедляет протекание апоптоза, что коррелирует с кинетикой активации РКА [27]. Антиапоптотический эффект активаторов цАМФ проиллюстрирован на рис.3, показывающем резкое возрастание жизнеспособности ГМК, нетрансфицированных E1A аденовирусом и находящихся в течение 108 ч в отсутствии ростовых факторов, но в присутствии активатора аденилатциклазы форсколина. Действие цАМФ на апоптоз в ГМК воздухопроводящих путей человека ограничено одиночным сообщением, документирующим ускорение этого процесса в присутствии сальбутамола и проникающего аналога цАМФ [23]. При сопоставлении этих данных с результатами нашего исследования можно заключить, что механизм вовлечения цАМФ в регуляцию апоптоза ГМК сосудов и воздухопроводящих путей принципиально различен. Следует, однако, отметить, что в отличие от нашей работы действие указанных выше соединений на активность РКА не контролировалось.

Ингибирование роста ГМК, отмеченное при долгосрочной активации системы цАМФ, рассматривается как фактор, препятствующий гипертрофии сосудис-



Рис.3. Фазово-контрастная микроскопия ГМК сосудов, инкубированных 36 и 108 ч в присутствии или в отсутствии 10% сыворотки. После 36 ч инкубации в отсутствии ростовых факторов наблюдается незначительное накопление апоптотических клеток, показанных стрелками. В клетках, обработанных активатором цАМФ (форсколин), происходит структурная реорганизация цитоскелета. Через 108 ч инкубации в отсутствии ростовых факторов и форсколина наблюдается полная гибель клеток, в то время как в присутствии форсколина только небольшая часть ГМК претерпевает апоптоз.

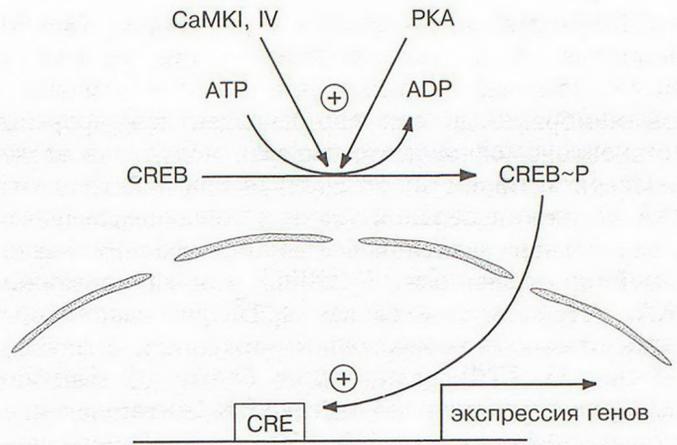


Рис.4. Механизм запуска экспрессии генов при активации цАМФ-сигнальной системы и при повышении внутриклеточной концентрации кальция.

CaMKI и CaMKIV — ( $\text{Ca}^{2+}$  + кальмодулин)-зависимые протеинкиназы типа I и IV. Объяснение остальных сокращений приведено в тексте.

той стенки [42]. Наряду с сосудами увеличение соотношения толщины стенки к просвету, отмеченное в воздухопроводящих путях больных астмой и получившее название ремоделинга (*remodelling*), рассматривается как один из основных факторов долгосрочного поддержания их повышенной чувствительности к действию бронхоконстрикторов [19]. Роль стероидных гормонов и  $\beta$ -агонистов в ремоделинге воздухопроводящих путей — предмет предстоящих исследований.

### $\beta$ -Агонисты как модуляторы экспрессии генов

Наряду с быстрыми эффектами активация цАМФ-сигнальной системы при действии  $\beta$ -агонистов пролонгированного действия может сопровождаться запуском экспрессии генов, промотор которых содержит так называемый ( $\text{Ca}^{2+}$ +цАМФ)-чувствительный элемент (CRE). Этот механизм опосредован фосфорилированием РКА соответствующего фактора транскрипции CREB (рис.4). В случае повышения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  тот же фактор транскрипции фосфорилируется ( $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин)-зависимой протеинкиназой (CaMK) [11]. Мы установили, что этот геномный механизм не принимает участия в ингибировании апоптоза ГМК, отмеченного при долгосрочной активации  $\beta$ -адреноцепторов [41]. Его роль в регуляции функции других клеток легких, вовлеченных в патогенез бронхиальной астмы, остается малоизученной.

### Внегеномные механизмы действия стероидных гормонов

Многочисленные данные о быстрых эффектах стероидных гормонов, полученные в экспериментах *in vivo*, привели к гипотезе о внегеномном или по крайней мере независимом от ядерных рецепторов механизме действия этих соединений [10]. В последнее время эта гипотеза получила подтверждение в экспериментах с использованием глюкокортикоидов (GC), иммобилизованных на молекуле альбумина

(GC-BSA) и не проникающих в цитоплазму (рис.5). Несмотря на многочисленные усилия, рецепторы глюкокортикоидов, локализованные на плазматической мембране, до сих пор не идентифицированы. Установлено, однако, что быстрая модуляция электрической активности, отмеченная при действии GC-BSA на клетки нервной ткани и сопровождающаяся параллельной активацией ( $Ca^{2+}$ +фосфолипид)-зависимой протеинкиназы С (PKC) и ингибированием PKA, устраняется в случае предварительной обработки этих клеток коклюшным токсином, инактивирующим  $G_i$  ГТФ-связывающие белки [9]. Так как PKC резко увеличивает активность митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК), фосфорилирующих многочисленные факторы транскрипции, можно предположить, что наряду с внегеномными эффектами стероидных гормонов они также могут модулировать экспрессию генома, минуя взаимодействия с ядерными рецепторами (см. рис.5). Роль этих сигнальных механизмов в регуляции функции легких, в том числе при сочетанном действии  $\beta$ -агонистов нуждается в дальнейшей проверке.

### Аденозиновые рецепторы как модуляторы воспалительной реакции: роль внеклеточного АТФ и цАМФ

Множественное действие аденозина на функцию клеток связано с тканеспецифичным представительством 4 различных рецепторов этого соединения ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  и  $A_3$ ) [15]. В середине 80-х годов XX века было продемонстрировано, что ингалированный аде-

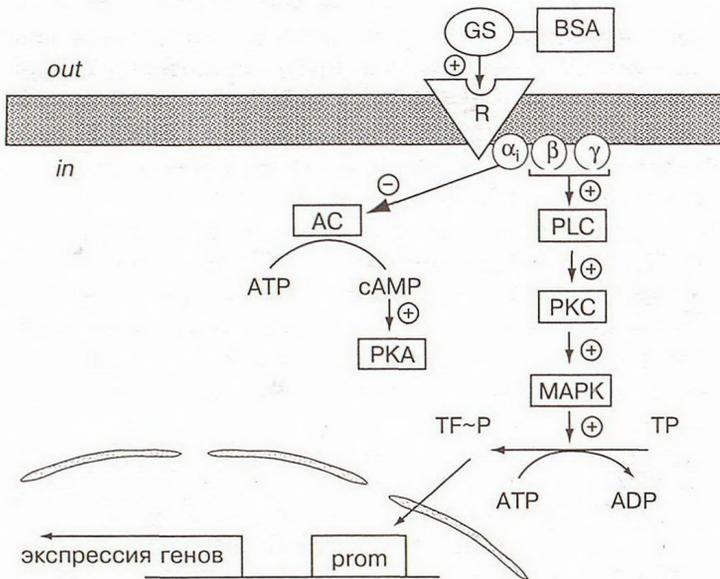


Рис.5. Схема, иллюстрирующая сигнальные механизмы действия глюкокортикоидов (GC), независимые от их взаимодействия с ядерными рецепторами.

R — рецептор стероидных гормонов, локализованный на плазматической мембране;  $\alpha_i$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  — субъединицы  $G_i$ -белка; PLC — фосфолипаза С; AC — аденилатциклаза; TF — факторы транскрипции; prom — промотор гена. + и — активирующие и ингибирующие сигналы соответственно. Другие обозначения приведены в тексте.

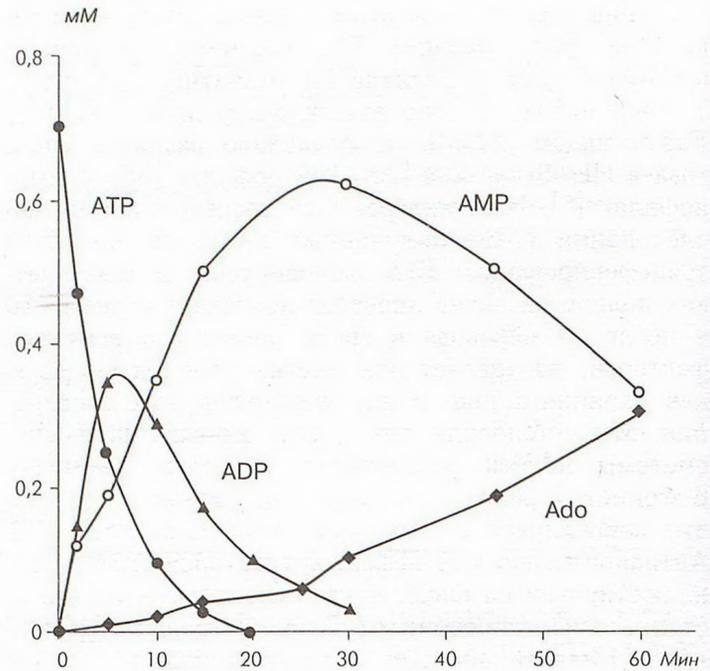


Рис.6. Кинетика катализа АТФ и накопление АДФ, АМФ и аденозина (Ado) при перфузии через изолированные аорты свиньи раствора, исходно содержащего 0,8 mM АТФ.

Перфузия проводилась при 37°C [16].

нозин вызывает бронхоконстрикцию у больных астмой [12]. Отсутствие подобного эффекта у здоровых пациентов, равно как и крайне слабая констрикция при действии аденозина на изолированные полоски гладкой мускулатуры воздухопроводящих путей *in vitro*, определило направление дальнейших исследо-

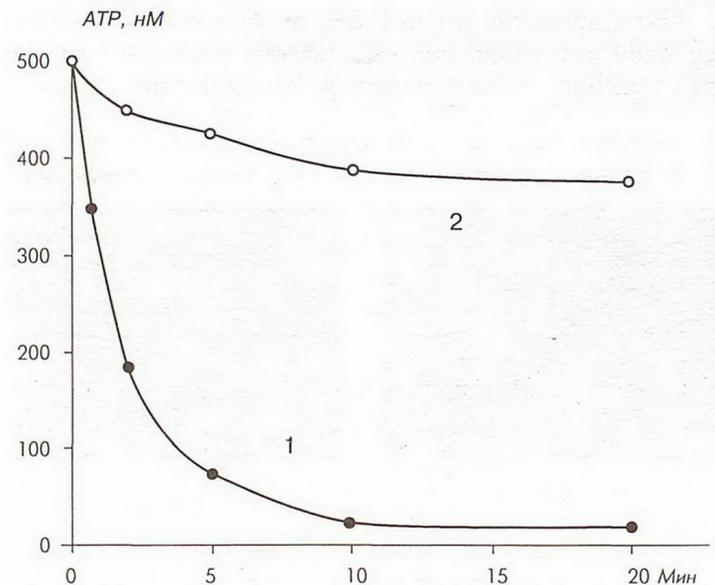


Рис.7. Кинетика деградации АТФ экто-АТФазами в альвеоцитах II порядка (1) и в клетках эпителия почек (2) крысы.

В отличие от данных, приведенных на рис.6, инкубация клеток проводилась при комнатной (20°C) температуре. Содержание АТФ в среде инкубации определялось по описанному ранее методу [39]. Данные получены совместно с Шантал Массе и Ивом Бертьем (Университет Монреаля, Канада).

ваний. В этих исследованиях было установлено, что бронхоконстрикция, вызванная аденозином, опосредована через активацию  $A_{2B}$  и, возможно,  $A_1$  пуринорецепторов тучных клеток [14,17]. Селективные агонисты этих рецепторов, доступные для клинических испытаний, отсутствуют. Было установлено, однако, что ингаляция антисенсорных олигонуклеотидов, подавляющих экспрессию  $A_1$  пуринорецепторов, снижает бронхоконстрикцию как на экспериментальных моделях аллергической астмы [27], так и у больных с астматическим синдромом [37].

Качественно иной механизм вовлечения аденозиновых рецепторов в патогенез бронхиальной астмы может быть предположен на основании результатов исследования *A. Охта* и *М. Ситковского* [28], проведенного на мышах, лишенных  $A_{2A}$ -рецепторов (*Adora2a<sup>-/-</sup>mice*). Как и следовало ожидать, специфический агонист  $A_{2A}$ -рецепторов (соединение CGS21680) не вызывал прироста содержания цАМФ в моноцитах, полученных из *Adora2a<sup>-/-</sup>*-животных, при их неизменном ответе на изопроterenол, что свидетельствовало об успешности проведенной процедуры "нокаута"  $A_{2A}$ -гена. Для данного обзора важным является то обстоятельство, что воспалительная реакция, вызванная инъекцией конканавалина А и оцененная по продукции цитокинов и морфологической оценке печени, завершалась к 6 ч у контрольных животных, в то время как у мышей, лишенных  $A_{2A}$ -рецепторов, она протекала вплоть до 48 ч.

Каковы возможные источники аденозина, приводящего к активации упомянутых выше пуринорецепторов? Ими могут быть клетки, целостность плазматической мембраны которых нарушена в результате воспалительной реакции. Тем не менее данные, имеющиеся по этому поводу, свидетельствуют о том, что более чувствительной к воспалению и другим стрессорным воздействиям, включая механическое раздражение, является неидентифицированная система, осуществляющая выброс АТФ [28]. Молекулярные механизмы функционирования этой сравнительно недавно обнаруженной системы остаются малоизученными. Важно, однако, отметить то обстоятельство, что благодаря высокоактивным внеклеточным ферментам высвобожденный из клетки АТФ быстро деградирует до аденозина (рис.6). Важным также является и то, что активность этой системы крайне высока в легких, что проиллюстрировано на примере сравнения кинетики деградации АТФ альвеоцитами II порядка и клетками почечного эпителия (рис.7). Регуляции выброса АТФ и активности эктоферментов стероидными гормонами и  $\beta$ -агонистами не исследовались. Заканчивая эту часть нашего обзора, мы хотели бы, однако, отметить, что долгосрочная активация  $\beta$ -адренорецепторов сама по себе способна приводить к повышению внутриклеточного уровня аденозина ввиду массивного выброса цАМФ и его последующей деградации экто-фосфодиэстеразой и 5'-нуклеотидазой. Этот аспект проблемы более подробно рассматривался нами ранее [29].

## Перспективы дальнейших исследований

Мы акцентировали наш краткий обзор на анализе возможных механизмов взаимодействия  $\beta$ -агонистов и стероидных гормонов, комбинированная ингаляция которых приносит положительные результаты при лечении астмы. Этот же анализ открывает и горизонты исследований, которые должны принести ответ на ряд сформулированных ниже вопросов.

Каков механизм бронхорасширяющего действия  $\beta$ -агонистов, который не затрагивает не только РКА, но и возможно другие сигнальные системы, опосредованные цАМФ?

Активация цАМФ-сигнальной системы оказывает тканеспецифическое влияние на пролиферацию и программируемую смерть клеток. В какой мере это явление участвует в коррекции ремоделинга воздухопроводящих путей при терапии агонистами  $\beta$ -адренорецепторов?

Связано ли противовоспалительное действие  $A_{1A}$ -рецепторов с активацией системы цАМФ? Какова роль этих рецепторов в функционировании легких? Каково относительное участие экстраклеточного цАМФ, генерируемого  $\beta$ -адренорецепторами, в активации  $A_{1A}$  и других пуринорецепторов?

В какой мере задействована внегеномная сигнализация стероидными гормонами в нормализации функции легких при астматическом воспалении? Влияют ли эти внегеномные пути на сигнал, генерируемый  $\beta$ -адренорецепторами?

Мы надеемся, что ответы, по крайней мере на некоторые из этих вопросов, будут получены в недалеком будущем.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Орлов С.Н., Баранова И.А., Покудин Н.И. Гладкомышечные клетки: внутриклеточные системы сигнализации и патология легких. В кн.: Чучалин А.Г. (ред.) Бронхиальная астма. М.: Агар; 1997; т.1: 52-67.
2. Орлов С.Н., Баранова И.А., Чучалин А.Г. Внутриклеточные системы сигнализации и патология легких. I. Гладкомышечные клетки. Пульмонология 1995; 2: 73-77.
3. Anderson G.P. Interactions between corticosteroids and  $\beta$ -adrenergic agonists in asthma disease induction, progression, and exacerbation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; 161: S188-S196.
4. Aranda A., Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. Physiol. Rev. 2001; 81: 1269-1304.
5. Barnes P.J. Scientific rationale for inhaled combination therapy with long-lasting  $\beta_2$ -agonists and corticosteroids. Eur. Respir. J. 2002; 19: 182-191.
6. Barnes P.J. The role of inflammation and anti-inflammatory medication in asthma. Respir. Med. 2002; 96 (suppl. A): S9-S15.
7. Brutsche M.H., Brutsche I.C., Wood P. et al. Apoptosis signals in atopy and asthma measured with cDNA arrays. Clin. Exp. Immunol. 2001; 123: 181-187.
8. Chang H.S., Jeon K.W., Kim Y.H. et al. Role of cAMP-dependent pathway in eosinophil apoptosis and survival. Cell Immunol. 2000; 203: 29-38.
9. Chen Y.Z., Qiu J. Possible genomic consequence of nongenomic action of glucocorticoids in neural cells. News Physiol. Sci. 2002; 16: 292-296.
10. Chen Y.Z., Qiu J. Pleiotropic signaling pathways in rapid, nongenomic action of glucocorticoids in mammalian neurons. Mol. Cell. Biol. Res. Commun. 1999; 2: 145-149.

11. Coulon V., Blanchard J.-M. Flux calciques et expression genique. *Med. Sci.* 2001; 17: 969-978.
12. Cushley M.J., Tallant N., Holgate S.T. The effect of dipyridamole on histamine- and adenosine-induced bronchoconstriction in normal and asthmatic subjects. *Eur. J. Respir. Dis.* 1985; 67: 185-192.
13. Dorscheid R.R., Wojcik K.R., Sun S., Marroquin B. et al. Apoptosis of airway epithelial cells induced by corticosteroids. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164: 1939-1947.
14. Feoktistov I., Biaggioni I. Role of adenosine in asthma. *Drug Dev. Res.* 1996; 39: 333-336.
15. Fredholm B.B., Abbracchio M.P., Burnstock G. et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* 1994; 46: 143-156.
16. Gordon J.L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.* 1986; 233: 309-319.
17. Holgate S.T. Adenosine: a key molecule of asthma or just another mediator? *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2002; 282: L167-L168.
18. Holtzman M.J., Green J.M., Jayaraman S., Arch R.H. Regulation of T cell apoptosis. *Apoptosis* 2000; 5: 459-471.
19. Holtzman M.J., Morton J.D., Shornick L.P. et al. Immunity, inflammation, and remodeling in the airway epithelial barrier: epithelial-viral-allergic paradigm. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 19-46.
20. Jun C.D., Pae H.O., Yoo J.C. et al. Cyclic adenosine monophosphate inhibits nitric oxide-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Cell. Immunol.* 1998; 183: 13-21.
21. Kankaanranta H., Lindsay M.A., Giembycz M.A. et al. Delayed eosinophil apoptosis in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 106: 77-83.
22. Lee M.-R., Liou M.-L., Yang Y.-F., Lai M.-Z. cAMP analogue prevent activation-induced apoptosis of T cell hybridomas. *J. Immunol.* 1993; 151: 5208-5217.
23. Luo Y., Lai W., Xu J. Pole of salbutamol in inducing apoptosis of cultured human airway smooth muscle cells. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2001; 24: 219-224.
24. McDonald T.F., Pelzer S., Trautwein W., Pelzer D.J. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 1994; 74: 365-412.
25. Nakamura M., Sunagawa M., Kosugi T., Sperelakis N. Actin filament disruption inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> channel current in cultured vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000; 279: C480-C487.
26. Nelson H.S. Advair: combination treatment with fluticasone propionate/salmeterol in the treatment of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107: 398-416.
27. Nyce J.W., Metzger W.J. DNA antisense therapy for asthma in an animal model. *Nature* 1997; 385: 721-725.
28. Ohta A., Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414: 916-920.
29. Orlov S.N., Maximova N.V. Efflux of cyclic adenosine monophosphate from cells: mechanisms and physiological implications. *Biochemistry (Moscow)* 1999; 64: 127-135.
30. Orlov S.N., Thorin-Trescases N., Dulin N.O. et al. Activation of cAMP signaling transiently inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells in a site upstream of caspase 3. *Cell Death Different.* 1999; 6: 691-672.
31. Orlov S.N., Tremblay J., Hamet P. cAMP signaling inhibits dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> influx in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1996; 27: 774-780.
32. Orlov S.N., Tremblay J., Hamet P. Cell volume in vascular smooth muscle is regulated by bumetanide-sensitive ion transport. *Am. J. Physiol.* 1996; 270: C1388-C1397.
33. Orlov S.N., Tremblay J., Hamet P. Altered  $\beta$ -adrenergic regulation of Na-K-Cl cotransport in cultured smooth muscle cells from the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 1995; 8: 739-747.
34. Palmqvist M., Aroldsson P., Beckman O. et al. Onset of bronchodilation of budesonide/formoterol vs salmeterol/fluticasone in single inhalers. *Pulm. Pharmacol.* 2001; 14: 29-34.
35. Parvathani L.K., Buescher E.S., Chacon-Cruz E., Beebe S.J. Type I cAMP-dependent protein kinase delays apoptosis in human neutrophils at a site upstream of caspase-3. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 6736-6743.
36. Piliponsky A.M., Levi-Schaffer F. Regulation of apoptosis in mast cells. *Apoptosis* 2000; 5: 435-441.
37. Sandrasagra A., Tang L., Leonard S.A. et al. RASONS: a novel antisense oligonucleotide therapeutic approach for asthma. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2001; 1: 979-983.
38. Sciorati C., Rovere P., Ferrarini M. et al. Autocrine nitric oxide modulates CD95-induced apoptosis in gamma-delta T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 23211-23215.
39. Skriabin G., Orlov S.N., Masse C., Berthiaume Y. Phloretin inhibits Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> uptake in cultured alveolar type II cells by reduction of cellular ATP content. *Exp. Lung Res.* 2000; 26: 319-333.
40. Spicuzza L., Belvisi M., Birell M.A. et al. Evidence that the anti-spasmogenic effect of the  $\beta$ -adrenoceptor agonist, isoprenaline, on guinea-pig trachealis is not mediated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 133: 1201-1212.
41. Taurin S., Ryazhski G.G., Maximova N.V. et al. Suppression of programmed cell death by intracellular cAMP is not mediated by expression of genes encoding an inhibitor of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)* 2002; 67: 303-310.
42. Thorin-Trescases N., Orlov S.N., Taurin S. et al. Antiproliferative effect of brief exposure to cholera toxin in vascular smooth muscle cells: role of cAMP and protein kinase A. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2001; 79: 471-480.
43. Vignola A.M., Chiappara G., Gagliardo R. et al. Apoptosis and airway inflammation in asthma. *Apoptosis* 2000; 5: 473-485.
44. Walsh G.M. Eosinophil apoptosis: mechanisms and clinical relevance in asthmatic and allergic inflammation. *Br. J. Haematol.* 2000; 111: 61-67.

Поступила 17.07.02