

С.Н.Орлов, И.А.Баранова, А.Г.Чучалин

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ СИГНАЛИЗАЦИИ И ПАТОЛОГИЯ ЛЕГКИХ. ТРАНСПОРТ ИОНОВ В КЛЕТКАХ ЭПИТЕЛИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

НИИ пульмонологии МЗ РФ, РГМУ

В предыдущем обзоре [2] мы суммировали данные о сигнальных системах гладкомышечной клетки дыхательных путей, а также основных направлениях фармакологической коррекции при обструктивных заболеваниях. В задачу этого обзора входит рассмотрение данных о клетках эпителия.

Долгое время эпителий дыхательных путей (ДП) рассматривался только как механический барьер от неблагоприятных факторов окружающей среды. Ныне существуют доказательства, что он, как и эндотелий сосудов, является метаболически активной тканью, которая наряду с продукцией слизи регулирует функцию гладких мышц ДП через выработку и утилизацию субстанций релаксирующего и констрикторного действия [35]. Установлено также, что дыхательный эпителий вовлечен в процессы пролиферации и дифференциации бронхиальных тучных клеток и выброса медиаторов с противовоспалительными свойствами [4].

Нарушение целостности эпителия дыхательных путей приводит к развитию бронхообструктивных заболеваний вследствие:

- 1) увеличения проницаемости для антигенов [4],
- 2) раздражения нервных окончаний и активации асонального рефлекса [7].
- 3) снижения выработки эпителийрелаксирующего фактора [18]. Недавно также было установлено, что, как и в случае сосудистого эндотелия, клетки эпителия ДП наряду с выработкой релаксирующих факторов секретируют эндотелин, вызывающий сокращение гладкомышечных клеток. Выработка этого пептидного гормона стимулируется липополисахаридами, факторами некроза опухолевых клеток (TNF α_2) и их трансформации (TGF β), интерлейкинами (IL-1) [32].
- 4) уменьшения содержания мембраносвязанной нейрорепептидазы, инактивирующей тахикинины (например, субстанция Р) [35],
- 5) увеличения образования продуктов липооксигеназного пути (лейкотриен В₄, продукты 15-липооксигеназного пути) [53], которые рассматриваются в качестве основных факторов активации хемотаксиса и формирования воспалительной реакции.

При бронхообструктивных заболеваниях ДП наблюдается нарушение физических свойств мокроты (осмолярность, вязкость и эластичность), что приводит к нарушению мукоцилиарного клиренса [52].

Продуцируемый эпителием ДП секрет состоит из двух компонентов: жидкого, вырабатываемого клетками реснитчатого эпителия, и геля, состоящего из гликопротеинов, которые секретируются бокаловидными клетками и подслизистыми железами. Толщина жидкого слоя влияет на контакт геля и ресничек: при ее увеличении клиренс мокроты замедляется. Объем и состав этого слоя и определяется процессами секреции и абсорбции, связанными с трансэпителиальным переносом электролитов и воды [12].

Более чем 40 лет назад С.С.Мacklin [30] предложил модель, согласно которой бронхиальная слизь секретируется дистальными отделами дыхательных путей (альвеолы, бронхи) и благодаря движению ресничек транспортируется в проксимальные отделы с меньшей общей площадью сечения. Появляющийся при этом избыток жидкости абсорбируется эпителием проксимальных дыхательных путей (трахеи). Эта функция эпителия ДП, связанная с согласованной работой ионотранспортирующих систем, была подвергнута обстоятельному исследованию в последнее десятилетие. Результаты этих исследований суммированы в данном обзоре.

1. Ионотранспортирующие системы клеток эпителия ДП

Абсорбция натрия складывается из следующих этапов (рис.1) [16]:

1. Диффузия ионов натрия в эпителиальную клетку через Na⁺-селективные каналы в апикальной мембране.
Эти каналы ингибируются низкими (0,1—1 μ M) концентрациями амилорида, а экспрессированные также в дистальных отделах нефрона и желудка были недавно клонированы в нескольких лабораториях. Они состоят из трех субъединиц (α , β , γ) и не имеют существенной гомологии с хорошо изученными потенциалзависимыми Na-каналами и

Na-каналами, сопряженными с п-холинорецепторами электрически возбудимых тканей [48].

2. Перемещения Na^+ в подслизистое пространство Na^+ , K^+ -АТФазой, локализованной на базолатеральной мембране и функционирующей в режиме электрогенного ($3\text{Na}^+/\text{K}^+$) насоса.
3. Удаление K^+ из клетки через K^+ -каналы.

Сопутствующие натрию ионы Cl^- перемещаются как через клетки эпителия, так и через межклеточное пространство по электрохимическому градиенту, созданному работой указанных выше систем. В клетках эпителия почечных канальцев реабсорбция Na^+ осуществляется также при участии систем Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта, Na^+ , Cl^- -котранспорта и Na^+/H^+ -обмена, локализованных на апикальной мембране. Сведения по этим переносчикам для реснитчатого эпителия бронхов немногочисленны и в основном получены косвенными методами [23]. В клетках почечного эпителия транспорт ионов через систему Na^+ , K^+ , 2Cl^- и Na^+ , Cl^- -котранспорта подавляется высокоэффективными (фуросемид, буметанид) и низкоэффективными — *low-ceiling* (производные тиазида) диуретиками. Относительная эффективность этих соединений в ингибировании Na^+ , K^+ , 2Cl^- и Na^+ , Cl^- -котранспорта в эпителии ДП не изучена.

Секреция хлора имеет много общего с процессом абсорбции натрия и включает в себя следующие процессы (см.рис.1):

1. Транспорт ионов Cl^- и Na^+ через базолатеральную мембрану за счет переносчика, функционирующего в режиме Na^+ , Cl^- или Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта.
2. Удаление Na^+ через Na^+ , K^+ -насос для поддержания соответствующего ионного градиента базолатеральной мембраны.
3. Диффузия Cl^- через Cl^- -селективные каналы апикальной мембраны.

В отличие от Na^+ -каналов к настоящему времени в клетках эпителия ДП идентифицировано несколько типов Cl^- -каналов: а) Cl^- -каналы, активируемые сАМФ-зависимой протеинкиназой и вовлеченные в патогенез муковисцидоза (см. подробнее ниже); б) Cl^- -каналы, активируемые (Ca^{2+} кальмодулин)зависимой протеинкиназой [17]; в) низкопроводящие каналы, активируемые набуханием клеток и ингибируемые 5-нитро-2-(3-фенилпропиламино)бензойной кислотой [36].

Сопутствующие транспорту Cl^- ионы Na^+ проходят между клетками по направлению трансэпителиальной электродвижущей силы, созданной деполяризующим эффектом Cl^- на апикальной мембране и гиперполяризующим эффектом K^+ на базолатеральной мембране.

Рядом исследователей высказывается предположение, что одни и те же участки слизистой могут обладать абсорбирующей и секретирующей функциями, поскольку в отличие от эпителия других органов (например, кишечника) эпителиальные клетки различных отделов дыхательных путей, осуществляющие электролитный транспорт, не различаются морфологически и функционально, и баланс между процессами

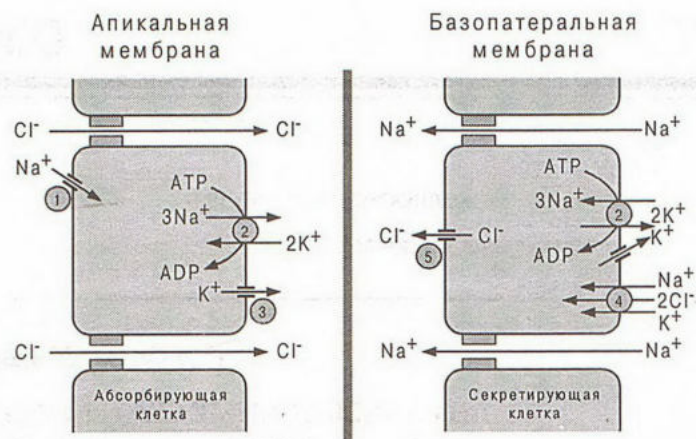


Рис.1. Схема механизмов абсорбции и секреции в эпителиальной клетке.

1. Na^+ -селективный канал. 2. Na^+ , K^+ -АТФаза. 3. K^+ -канал. 4. Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорт. 5. Cl^- -канал.

абсорбции и секреции в каждом участке слизистой определяет толщину и состав слизи [16].

В этой связи нам представляется особенно важным исследование механизма ауторегуляции состояния секреции и абсорбции NaCl и осмотически связанной воды по принципу отрицательной обратной связи. Мы предполагаем, что изменение осмолярности мукоцилиарного клиренса по мере продвижения от дистальных к проксимальным отделам ДП может быть достаточным условием для регуляции этого процесса за счет изменения объема клеток эпителия. Предпосылкой для этой гипотезы служат экспериментальные данные об объемзависимой регуляции проводимости Cl^- -каналов [36] и Na^+ , Cl^- -котранспорта [34], полученные в последнее время. Сведения об объемной регуляции Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта и Na^+/H^+ -обмена в эпителии ДП к настоящему времени не представлены. Данные по этому вопросу, полученные для других клеток, суммированы нами ранее [3].

2. Регуляция гормонами и нейротрансммиттерами

Регуляция транспорта ионов в клетках эпителия ДП лучше всего изучена на примере системы сАМР. Известно, что активация сАМР сигнальной системы не только увеличивает транспорт Cl^- через апикальную мембрану эпителия ДП, но и приводит к резкому возрастанию трансцеллюлярного переноса NaCl и связанной с этим секреции воды [12]. Для объяснения этого явления следует предположить, что сАМР также вызывает возрастание транспорта Cl^- через базолатеральную мембрану эпителиальных клеток. Исходя из данных о частичном ингибировании сАМР-зависимого прироста секреции Cl^- буметанидом [56], можно предположить, что сАМР также активирует систему Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта. Это предположение было подтверждено в опытах по изучению связывания [3H]-буметанида. Было установлено, что в клетках эпителия ДП собаки стимуляция этого переносчика системой сАМР связана как с прямым влиянием протеинкиназы А на его активность, так и опосредованно через уменьшение концентрации внутриклеточного

Cl^- за счет активации Cl^- -каналов на апикальной мембране [21].

Бета-адренергические агонисты (β_1 - и β_2 -адренорецепторы) и другие активаторы аденилатциклазы (аденозинрецепторы A_2 типа, простагландины E_1 и E_2), а также ингибиторы фосфодиэстеразы (теофиллин) вызывают увеличение содержания сАМР. Этот циклический нуклеотид в свою очередь активизирует сАМР-зависимые протеинкиназы, которые, вероятно, фосфорилируют белки — транспортеры Na^+ и Cl^- в апикальной мембране эпителиальной клетки [43]. Взаимодействие АТФ и ГТФ с пуринергическими (P_2) рецепторами также активирует Cl^- каналы [33]. Следует, однако, заметить, что эти каналы отличаются от Cl^- -каналов, активируемых сАМР. Подробнее этот вопрос будет рассмотрен нами на примере муковисцидоза.

Меньше известно о вовлечении системы ингибирования аденилатциклазы в регуляцию трансэпителиального переноса электролитов и воды, через которую воздействуют альфа-адренергические и мускариновые рецепторы.

Лейкотриены и брадикинин, другие медиаторы тучных клеток воздействуют на секретирующий эпителий не прямо, а опосредованно — через продукцию простагландинов, которые увеличивают содержание сАМР, что в конечном итоге приводит к усилению секреции [28]. Таким образом, тучная клетка может играть значительную роль в регуляции физикальных свойств мокроты и, следовательно, ее клиренса.

Роль фосфоинозитидного превращения в контроле трансапителиального переноса ионов в настоящее время лишь предполагается. По аналогии с другими неэпителиальными клетками некоторые авторы склонны считать, что увеличение внутриклеточной концентрации инозитолтрифосфата приведет к мобилизации кальция из внутриклеточных запасов в цитозоль и связыванию кальция с кальмодулином. Ca^{2+} /кальмодулиновый комплекс, а также протеинкиназа С, активируемая диацилглицеролом, возможно, фосфорилируют протеины, участвующие в процессах транспорта электролитов и воды в дыхательном эпителии [43].

Большое значение имеет кальций в процессах трансэпителиального транспорта электролитов и воды. Ионы кальция активируют секрецию хлора, регулируя проводимость ионов через базолатеральную мембрану и подавляя абсорбцию натрия [50] вследствие активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмена и увеличения внутриклеточного содержания натрия. Важную роль в процессе секреции играют Ca^{2+} -активированные K^+ -каналы базолатеральной мембраны [40].

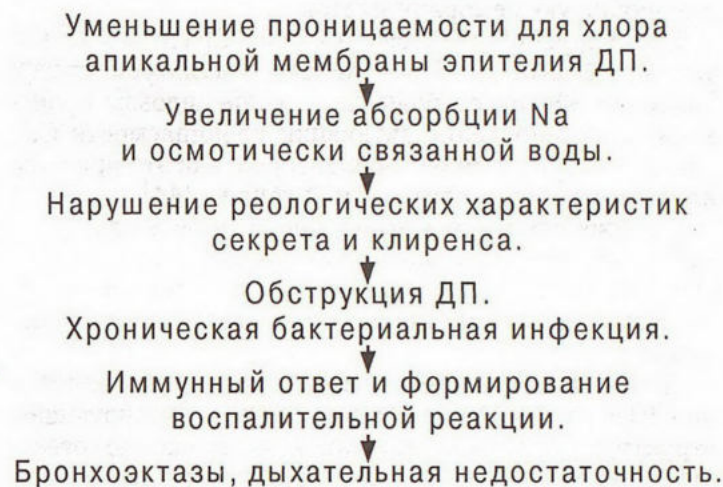
3. Патопфизиология нарушений ионотранспортирующих функций эпителия ДП

Дефекты ионотранспортирующих систем, а следовательно, и нарушения водно-электролитного обмена эпителия воздухопроводящих путей человека наиболее ярко могут быть представлены на примере муковисцидоза (*cystic fibrosis*). Болезнь проявляется в нарушении транспорта электролитов в эпителии дыхательных путей и кишечника, а также в экзокринных железах (поджелудочной, слюнных и потовых) [10,42].

Все эти ткани продуцируют белоксодержащую жидкость, необходимую для функции пищеварения и защиты. Для осуществления нормального функционирования важно поддержание правильного состава ионов, белков и воды.

В нормальном дыхательном эпителии Cl^- каналы активируются (открываются) при увеличении внутриклеточного уровня сАМР. сАМР открывает Cl^- каналы через активацию сАМР-зависимой протеинкиназы, которая фосфорилирует сам Cl^- канал или ассоциированный регуляторный протеин. При муковисцидозе нарушения затрагивают прежде всего регуляцию трансэпителиального переноса Cl^- [15,55], а именно блокируют активацию агентами, повышающими сАМР, проницаемость Cl^- каналов [49].

Последовательность событий при развитии патологической картины муковисцидоза в легких может быть представлена следующей схемой [25].



Данные, полученные в нашей лаборатории, позволяют дополнить эту картину [27]. В этих исследованиях было установлено, что даже незначительное уменьшение осмолярности резко снижает эффективность кислородного взрыва в нейтрофилах, что должно найти отражение в падении эффективности воспалительной реакции и увеличении чувствительности к бактериальной инфекции у больных муковисцидозом.

Условно дефект, ответственный за развитие муковисцидоза, получил название CFTR — *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Для гена CFTR была установлена структура и установлено наличие мутации у больных муковисцидозом [24,45, 47]. На основании изучения последовательности ДНК CFTR [45] и белка, синтезированного *in vivo* и *in vitro* [20], установлено, что этот белок имеет гидрофобные участки (предположительно трансмембранные домены) и может быть фосфорилирован. Как показали исследования, у 70% больных муковисцидозом эта мутация выражена в делеции 3 пар оснований, в результате чего теряется фенилаланин в позиции 508 ($\Delta F508$) [24,29].

Видимо, именно этот тип мутации приводит к потере чувствительности Cl^- -канала к сАМР. Описаны также другие мутации CFTR, когда продукт мутированного гена с нормальной чувствительностью к сАМР

Таблица 1

Влияние внутриклеточного cAMP и кальция на ток, измеренный на клетках эпителия легких больных муковисцидозом, трансформированных геном CFTR или его мутантной формой ($\Delta F508$) [44]

	Интенсивность тока, опосредованного Cl-каналами (pA)		
	Контроль	+cAMP	+Ca ²⁺
CFTR	68	173	981
CFTR $\Delta F508$	54	13	945

Примечание. Ток был измерен методом "whole-cell patch-clamp" при заингибированной амилоридом (10 μ M) Na⁺-проводимости и в присутствии ингибитора циклооксигеназы (индометацин-3 μ M).

локализован в цитоплазме и не способен встраиваться в апикальную мембрану клеток.

При вирусной трансфекции гена CFTR (но не мутантной формы CFTR — $\Delta F508$) в культуру клеток эпителия легких от больных муковисцидозом происходит восстановление активации проницаемости Cl⁻-каналов агонистами бета-рецепторов, как это присуще клеткам эпителия контрольной группы [44].

Как уже отмечалось выше, проводимость для ионов Cl⁻ контролируется также внутриклеточным Ca²⁺ за счет активации кальмодулинзависимой протеинкиназы. Эта система регуляции не изменена при муковисцидозе.

Долгое время обсуждался вопрос о том, является ли CFTR непосредственно локусом гена, кодирующим структуру Cl⁻-канала, или какой-то его частью, ответственной за регуляцию cAMP. Получение достаточно больших количеств CFTR дало возможность убедиться, что этот белок в самом деле является каналоформером для Cl⁻, причем мутация, затрагивающая часть аминокислот, приводит к изменению селективности канала [5]. Этот вывод был подтвержден в опытах по встраиванию CFTR в искусственные фосфолипидные мембраны [8]. К аналогичному заключению пришли на основании изучения влияния экспрессии CFTR в неэпителиальных клетках насекомых [22] или млекопитающих (клетки HeLa и ЗТЗ фибробласты) [9], которые исходно лишены cAMP-зависимых Cl⁻-каналов. В этих экспериментах была также осуществлена регистрация электрической активности одиночного канала. Было установлено, что он обладает низкой проницаемостью (8—10 pS), проницаем для I⁻ ($pI^-/pCl^- \approx 6,42$) и обладает линейной вольт-амперной характеристикой, т.е. не относится к категории потенциалуправляемых каналов [9]. Обнаружено также, что для индукции Cl⁻-каналов в мембране фибробластов, инфицированных CFTR, достаточно ввести на цитоплазматическую сторону мембраны АТФ (АТР) и каталитическую субъединицу протеинкиназы А [9], т.е. бета-адренергическая регуляция канала происходит по механизму: агонист $\rightarrow$ бета-рецептор $\rightarrow$ Gs $\rightarrow$ аденилатциклаза $\uparrow$ $\rightarrow$ cAMP $\uparrow$ $\rightarrow$ протеинкиназа А $\uparrow$ $\rightarrow$ Cl⁻-канал $\uparrow$ (рис.2).

Интересно отметить, что Cl⁻-каналы с подобными свойствами были описаны ранее в клетках эпителия, не имеющего отношения к муковисцидозу [19,54]. Эти данные позволяют облегчить функциональную диагностику CF, используя для этой цели лимфоциты. Такая диагностика, наряду с молекулярно-биологическим тестированием локуса CFTR и исследованием активности Cl⁻-канала и других систем, вовлеченных в транспорт Na⁺ и Cl⁻ (Na⁺-канал, Na⁺, K⁺, 2Cl⁻-котранспорт, Na⁺, K⁺-АТФазы), на культуре эпителия носа позволит подойти к разработке индивидуальной терапии муковисцидоза — моногенного заболевания с наибольшим количеством летальных исходов.

Последние успехи в изучении функции CFTR дали объяснение механизму улучшения функции легких у больных муковисцидозом при вакцинации коклюшным токсином [38]. Установлено, что обработка коклюшным токсином или негидролизующим аналогом ГДФ (GDP β S), т.е. агентами, ингибирующими ГТФ (GTP)-связывающие белки, увеличивает Cl⁻ проводимость клеток эпителия больных CF и восстанавливает их чувствительность к cAMP. Напротив, в нормальных клетках эпителия Cl⁻ проводимость резко уменьшается при обработке активаторами ГТФ-связывающих белков (GTP γ S, ALF₄⁻). При этом также устраняется активирующее влияние на Cl⁻ проводимость системы cAMP (рис.3).

На основании приведенных данных можно предположить следующую схему регуляции секреции Cl⁻ клетками эпителия ДП ГТФ-белками G_i типа, взаимодействующими с коклюшным токсином (рис.4). В отсутствие внешних стимулов, сопряженных с G_i-белками, эти белки находятся в виде гетеротримера $\alpha_i\beta\gamma$, причем α_i -субъединица содержит ГДФ, в то время как содержание активированных G_i, т.е. диссоциированных на комплекс α_i -GTP и $\beta\gamma$ невелико. В норме

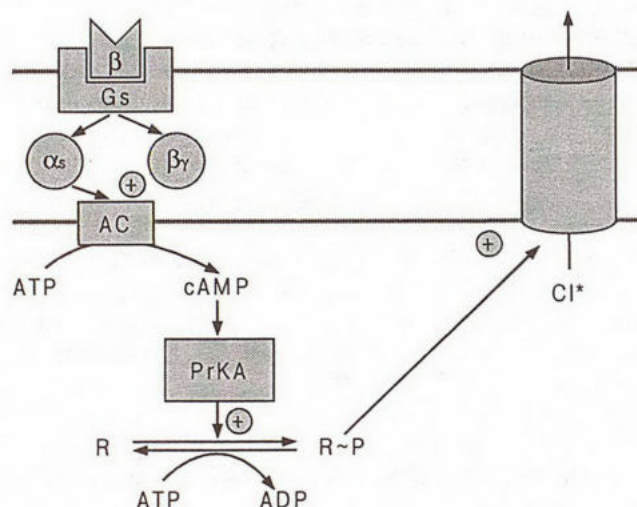


Рис.2. Регуляция проницаемости Cl⁻-каналов в эпителии ДП системой cAMP.

β — бета-адренорецептор; G_s, α_s , γ GTP — GTP-связывающий белок и его субъединицы, сопряженные с аденилатциклазой (AC); PrKA — протеинкиназа А; R — гипотетический регулятор, связанный с функционированием Cl⁻-канала. При муковисцидозе нарушается трансдукция сигнала от PrKA на Cl⁻-канал. (+) — воздействия, активирующие систему.

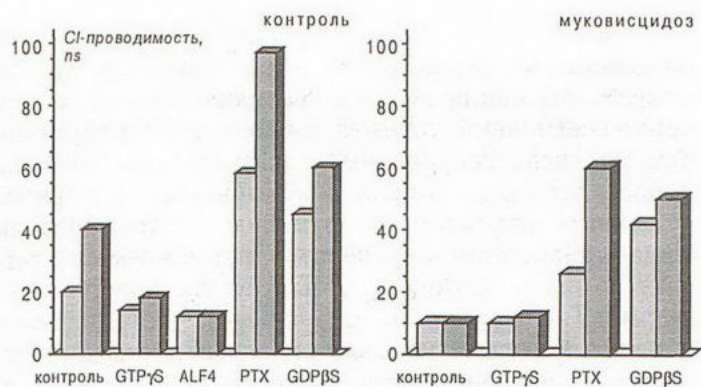


Рис.3. Влияние cAMP, GTPγS, GDPβS, ALF⁻₄ и коклюшного токсина на хлорную проводимость клеток эпителия ДП в норме и у больных муковисцидозом [51].

Cl⁻-каналы обладают низким сродством к α_i и способны активироваться протеинкиназой А. При CF имеет место точечная мутация (делеция фенилаланина) в результате чего Cl⁻-канал проявляет высокое сродство к α_i и в результате этого взаимодействия или по независимым механизмам, опосредованным регуляторным R-белком (см. рис.2), теряется чувствительность к протеинкиназе А и проницаемость для Cl⁻ резко ухудшается. По данным работы [51] Cl⁻-канал взаимодействует с α_{i2} и α_{i3} субъединицами. Нельзя, однако, исключить возможность того, что в инактивации Cl⁻-канала принимают участие βγ субъединицы или неидентифицированная сигнальная система, связанная с этими G_i-белками. Для подтверждения этой гипотезы, представленной на рис.4, необходимо проведение дополнительных исследований.

4. Фармакологическая коррекция нарушений транспорта ионов в эпителии ДП

В современной терапии бронхообструктивных заболеваний привлекает внимание использование диуретика фуросемида, действующего в почке на уровне восходящей части петли Генле. Эффективность его действия продемонстрирована у больных бронхиальной астмой, а также в лабораторных экспериментах на сенсibilизированных животных. Фуросемид не способен купировать бронхоспазм, а может лишь предупреждать его развитие. Многочисленными исследованиями продемонстрирована способность препарата при ингаляционном аэрозольном введении больным бронхиальной астмой оказывать защитное действие на дыхательные пути при провокации бронхообструкции аллергенами, купируя как раннюю, так и позднюю аллергическую реакцию "туманом" дистиллированной воды, метасульфитом, аденозин-5-монофосфатом, а также физической нагрузкой [26,46]. Меньшее протективное действие фуросемид оказывает при бронхоконстрикции, вызванной гистамином. Провокация же метилхолином либо не предупреждалась препаратом [37], либо защитное действие его было небольшим [41].

У больных бронхиальной астмой препарат эффективен лишь при ингаляционном введении (40 мг), но не пероральном или парентеральном введении [13].

По-видимому, это связано с малыми дозами вводимого такими способами фуросемида или же с низкой концентрацией вещества, накапливаемой в дыхательных путях.

Предполагается, что фуросемид может оказывать воздействие на различные функции дыхательного эпителия. Прежде всего он влияет на ионный транспорт и как следствие этого регулирует состав жидкости, вырабатываемой эпителием. Исследованиями *in vitro* было показано, что фуросемид ингибирует вход хлора через систему Na⁺,K⁺,2Cl⁻-котранспорта в базолатеральной мембране. В результате этого снижается секреция натрия и хлора. Проведенные исследования *in vivo* на здоровых добровольцах показали, что фуросемид достоверно изменяет разницу потенциалов слизистой оболочки носа, регулируя транспорт электролитов в ней [57]. Изменение ионных градиентов меняет осмолярность эпителиальной жидкости, а это в свою очередь может воздействовать на выброс медиаторов из клеток, находящихся в просвете дыхательных путей, вызывать уменьшение чувствительности нервных волокон, участвующих в процессе нейrogenного воспаления [14,26].

Интересно, однако, что ингибирование Na⁺,K⁺,Cl⁻-котранспорта фуросемидом в эпителии ДП в условиях *in vitro* наблюдалось только тогда, когда препарат действовал на внутреннюю базолатеральную поверхность эпителиальных клеток [38]. Однако *in vivo* аэрозольный фуросемид может попасть лишь к наружной слизистой поверхности эпителия, обращенной в просвет дыхательных путей. Эффективность его действия при ингаляционном введении объясняется, по-видимому, тем, что при бронхиальной астме увеличивается проницаемость эпителия. Это позволяет лекарственному препарату достигать внутренней поверхности эпителиальной клетки [13].

Выдвигаются и контраргументы такого объяснения влияния фуросемида на данную функцию дыхательного эпителия. Так, в экспериментах O.Connor [37] исследовался помимо фуросемида другой диуретик — буметанид. Он также ингибирует Na⁺,K⁺,2Cl⁻-котранспорт в петле Генле и по своей эффективности более

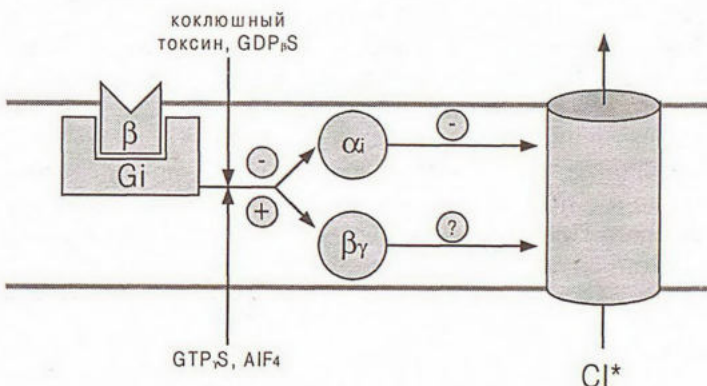


Рис.4. Регуляция проницаемости Cl⁻-каналов в эпителии ДП агентами, воздействующими на GTP-связывающие белки G_i типа.

R — рецептор, активирующий G_i-белки; α_i и βγ — субъединицы G_i-белка.

чем в 40 раз сильнее фуросемида. Однако буметанид не смог оказать протективного действия на бронхоконстрикцию в отличие от фуросемида. И это в известной мере ставит под сомнение указанный путь действия препарата и требует дальнейшего уточнения.

Возможен и другой механизм, объясняющий эффективность препарата у больных бронхиальной астмой. Предполагается, что по аналогии с сосудистым эндотелием препарат может вызывать высвобождение простагландинов с бронходилатирующим действием из эпителия дыхательных путей [13].

Прямое действие фуросемида на другие клетки легких маловероятно. В самом деле, нам не удалось обнаружить влияния этого соединения на электролитный баланс изолированных гладкомышечных клеток (данные подготовлены к печати) и на формирование кислородного взрыва в нейтрофилах [1].

Традиционная терапия муковисцидоза включает механический клиренс ДП и антибиотики против *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, т.е. направлена на коррекцию терминальной стадии патогенеза этого заболевания. В последнее время активно разрабатываются генно-инженерные подходы для терапии муковисцидоза, связанные прежде всего с направленной доставкой в клетки эпителия ДП цДНК, кодирующей немутированные CFTR. Как мы уже отмечали выше, эксперименты такого типа *in vitro* уже проведены и увенчались полным успехом. *In vitro* доставка генетического материала в клетки эпителия ДП может быть реализована с использованием явления рецепторопосредованного эндоцитоза с использованием Fab-фрагментов поликлональных антител [14] или аденовирусов [58].

Нормального клиренса при муковисцидозе можно, по-видимому, достичь, применяя менее радикальные, но более экономичные подходы, направленные на модификацию других ионтранспортирующих систем. Так, например, как уже отмечалось выше, Cl^- -секреция может быть достигнута за счет активации Ca^{2+} -зависимых Cl^- -каналов. Такие подходы могут быть разработаны при детальном фармакологическом исследовании этой системы. Нарушенный мукоцилиарный клиренс может быть восстановлен за счет снижения реабсорбции Na^+ при ингибировании Na^+ -каналов амилоридом. Первые исследования с использованием аэрозольной формы амилорида показали эффективность такого рода терапии [6]. Было также установлено, что эффективность такой терапии связана не только с частичным восстановлением мукоцилиарного клиренса, но и с приостановлением развития воспалительной реакции. Последнее находит свое объяснение в рамках ингибирования амилоридом окислительного взрыва [1]. Более полный уровень коррекции удалось достичь при комбинированном аэрозольном введении амилорида УТР. Как мы уже отмечали выше, это соединение наряду с сАМР открывает Cl^- -каналы, отличные от CFTR. Преимущество УТР по отношению к АТФ объясняется отсутствием его взаимодействия с рецепторами, активирующими G_i -белки и ингибирующими Cl^- -проводимость — см.рис.4. (подробнее см.обзор [25]).

Более специфическую терапию болезней легких, связанных с патологией клеток эпителия, удастся разработать при проведении фармакологического скрининга соединений для изоформ ионтранспортирующих белков, экспрессированных в этих клетках. Очевидны и последствия такого рода исследований, связанных с побочным эффектом на функцию клеток эпителия ряда лекарственных препаратов, применяемых в терапии болезней легких и, в частности, бронхиальной астмы. Так, например, установлено, что длительная терапия приступов удушья бета-адренергическими агонистами приводит к резкому падению чувствительности этой системы в клетках эпителия, что и является причиной нарушений мукоцилиарного клиренса [31,39].

Заканчивая этот обзор, отметим, что список цитированной литературы не обнаруживает какого-либо существенного вклада отечественных лабораторий в разработку этих вопросов. Более того, даже само написание этого мини-обзора было бы невозможно без помощи наших зарубежных коллег. Причины такого положения дел в постперестроечной России очевидны и свидетельствуют о ее движении в сторону самых слаборазвитых стран третьего мира. Будущие поколения не простят нам того, что на фоне авантюристического решения сиюминутных задач мы забыли о самой главной задаче — охране национального здоровья, которая на данном этапе невозможна без развития фундаментальных медико-биологических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кучкина Н.В., Орлов С.Н., Чучалин А.Г. Роль ионтранспортирующих систем в активации "кислородного взрыва" нейтрофилов человека: влияние осмотичности среды // Биол. мембраны. — 1994. — Т.11, № 2. — С.174—179.
2. Орлов С.Н., Баранова И.А., Чучалин А.Г. Внутриклеточные системы сигнализации и патология легких. I. Гладкомышечные клетки // Пульмонология. — 1995. — № 2. — С.73—78.
3. Орлов С.Н., Гурло Т.Г. Механизмы активации транспорта ионов при изменении объема клетки // Цитология. — 1991. — Т.33, № 11. — С.101—110.
4. Allergra L., Fabbri L.M., Picot G., Mattoli S. Bronchial epithelium and asthma // Eyr. Respir J. — 1989. — Vol.2, Suppl.6. — P.460—468.
5. Anderson M.P., Gregory R.G., Thompson S. et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity // Science. — 1991. — Vol.253. — P.202—205.
6. App E.M., King M., Helfesrieder R. et al. Acute and long-term amiloride inhalation in cystic fibrosis lung disease. A rational approach to cystic fibrosis therapy // Am. Rev. Respir. Dis. — 1990. — Vol.141, № 3. — P.606—612.
7. Barnes P.J. Neural control of human airways in health and disease // Ibid. — 1986. — Vol.134, № 6. — P.1289—1314.
8. Bear C.E., Li C., Kartner N. et al. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) // Cell. — 1992. — Vol.68. — P.809—818.
9. Berger H.A., Anderson M.P., Gregory R.J. et al. Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel // J. Clin. Invest. — 1991. — Vol.88. — P.1422—1431.
10. Boat T.F., Welsh M.J., Beaudet A.L. Cystic fibrosis // Metabolic Basis of Inherited Disease / Eds C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle - New York: McGraw Hill, 1989. — P.2709—2717.
11. Boucher R.C., Hviid Larsen E. Comparison of ion transport by cultured secretory and absorptive canine airway epithelia // Am. J. Physiol. — 1988. — Vol.254. — P.C535—C547.

12. Boucher R.C., Van Scott M.R., Willumsen N., Scutts M.J. Mechanisms and cell biology of airway epithelial injury // *Am. Rev. Respir. Dis.*— 1988.— Vol.138, № 6.— Pt 2.— P.S41—S44.
13. Chung K.F., Barnes P.J. Inhaled frusemide and asthma // *Lancet.*— 1990.— Vol.335, № 8695.— P.944—946.
14. Fercol T., Perales J.C., Eckman E. et al. Gene transfer into the airway epithelium of animals by targeting the polymeric immunoglobulin receptor // *J. Clin. Invest.*— 1995.— Vol.95, № 2.— P.493—502.
15. Frizzell R.A., Rechkemmer G., Shoemaker R.L. Altered regulation of airway epithelial cell chloride channels in cystic fibrosis // *Science.*— 1986.— Vol.233.— P.558—560.
16. Frizzell R.A. Role of absorptive and secretory processes in hydration of the airway surface // *Am. Rev. Respir. Dis.*— 1988.— Vol.138, № 6.— Pt 2.— P.S3—S6.
17. Fuller C.M., Ismailov I., Keeton D.A., Benos D.J. Phosphorylation and activation of a bovine tracheal anion channel by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II // *J. Biol. Chem.*— 1994.— Vol.269, № 43.— P.26642—26650.
18. Gao Y., Vanhoutte P.M. Epithelium acts as a modulator and a diffusion barrier in the responses of canine airway smooth muscle // *J. Appl. Physiol.*— 1994.— Vol.76, № 5.— P.1843—1847.
19. Gray M.A., Harris A., Coleman L. et al. Two types of chloride channel of duct cells cultured from human fetal pancreas // *Am. J. Physiol.*— 1989.— Vol.257.— P.C240—C251.
20. Gregory R.J., Cheng S.H., Rich D. et al. Expression and characterization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator // *Nature.*— 1990.— Vol.347.— P.382—386.
21. Haas M., McBrayer D.G., Yankaskas J.R. Dual mechanisms for Na-K-Cl cotransport regulation in airway epithelial cells // *Am. J. Physiol.*— 1993.— Vol.264.— P.C189—C200.
22. Kartner N., Hanrahan J.W., Jensen T.J. et al. Expression of cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance // *Cell.*— 1991.— Vol.64.— P.681—691.
23. Kemp P.J., Roberts G.C., Boyd C.A. Identification and properties of pathways for K^{+} transport in guinea-pig and rat alveolar epithelial type II cells // *J. Physiol.*— 1994.— Vol.476, № 1.— P.79—88.
24. Kerem B.S., Rommens J.M., Buchanan J.A. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis // *Science.*— 1989.— Vol.245.— P.1073—1080.
25. Knowles M.R., Oliver K.N., Hohneker R.W. et al. Pharmacologic treatment of abnormal ion transport in the airway epithelium in cystic fibrosis // *Chest.*— 1995.— Vol.107.— P.715—765.
26. Knox A.J., Ajao P. Effect of frusemide on airway smooth muscle contractility in vitro // *Thorax.*— 1990.— Vol.45.— P.856—859.
27. Kuchkina N.V., Orlov S.N., Pokudin N.I., Chuchalin A.G. Volume-dependent regulation of respiratory burst of activated human neutrophils // *Experientia.*— 1993.— Vol.49.— P.995—997.
28. Leikauf G.D., Ueki I.F., Widdicombe J.H., Nadel J.A. Alteration of chloride secretion across canine tracheal epithelium by lipoxygenase products of arachidonic acid // *Am. J. Physiol.*— 1986.— Vol.250, № 1.— P.F47—F53.
29. Lemna W.K., Gerald L.F., Batsheva K. et al. Mutation analysis for heterozygote detection and the prenatal diagnosis of cystic fibrosis // *N. Engl. J. Med.*— 1990.— Vol.322.— P.291—296.
30. Macklin C.C. Pulmonary sumps, dust accumulation, alveolar fluid and lymph vessels // *Acta Anat.*— 1955.— Vol.23, № 1.— P.1—33.
31. Mardini I.A., Higgins N.C., Zhou S. et al. Functional behavior of the beta-adrenergic receptor-adenylyl cyclase system in rabbit airway epithelium // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*— 1994.— Vol.11, № 3.— P.287—295.
32. Markewitz B.A., Kohan D.E., Michael J.R. Endothelin-1 synthesis, receptors, and signal transduction in alveolar epithelium: evidence for an autocrine role // *Am. J. Physiol.*— 1995.— Vol.268, № 2.— Pt 1.— P.L192—200.
33. Mason S.J., Paradiso A.M., Boucher R.C. Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium // *Br. J. Pharmacol.*— 1991.— Vol.103.— P.1649—1656.
34. Musch M.W., Field M. K^{+} -independent Na-Cl cotransport in bovine tracheal epithelial cells // *Am. J. Physiol.*— 1989.— Vol.256.— P.C658—C665.
35. Nadel J.A. Some epithelial metabolic factors affecting airway smooth muscle // *Am. Rev. Respir. Dis.*— 1988.— Vol.138, № 6.— Pt 2.— P.S22—S23.
36. Nilius B., Seherer J., Viana F. et al. Volume-activated Cl^{-} currents in different mammalian non-excitable cell types // *Pflügers Arch.*— *Eur. J. Physiol.*— 1994.— Vol.428, № 3—4.— P.364—371.
37. O'Connor B.J., Chung K.F., Chen-Worsdell Y.M. et al. Effect of inhaled frusemide and bumetanide on adenosine 5-monophosphate and sodium metabisulfite-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects // *Am. Rev. Respir. Dis.*— 1991.— Vol.143, № 6.— P.1329—1333.
38. Padnos E. Treatment of the pulmonary aspects of mucoviscidosis by injection of pertussis vaccine // *Rev. Allergy.*— 1965.— Vol.19.— P.468—414.
39. Penn R.B., Kelsen S.G., Benovic J.L. Regulation of beta-agonist- and prostaglandin E₂-mediated adenylyl cyclase activity in human airway epithelial cells // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*— 1994.— Vol.11, № 4.— P.496—505.
40. Petersen O.H., Maruyama Y. Calcium-activated potassium channels and their role in secretion // *Nature.*— 1988.— Vol.307, № 5953.— P.693—696.
41. Polosa R., Lau L.C.K., Holgate S.T. Inhibition of adenosine 5-monophosphate and methacholine-induced bronchoconstriction in asthma by inhaled frusemide // *Eur. Respir. J.*— 1990.— Vol.3, № 6.— P.665—672.
42. Quinton P. Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport // *FASEB J.*— 1990.— Vol.4.— P.2709—2717.
43. Rechkemmer G.R. The molecular biology of chloride secretion in epithelia // *Am. Rev. Respir. Dis.*— 1988.— Vol.136, № 6.— Pt 2.— P.S7—S9.
44. Rich D.P., Anderson M.P., Gregory R.J. et al. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells // *Nature.*— 1990.— Vol.347.— P.358—363.
45. Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B.S. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of cDNC // *Science.*— 1989.— Vol.245.— P.1066—1073.
46. Robuschi M., Pieroni M., Refini M. et al. Prevention of antigenic-induced obstructive reaction by inhaled furosemide in (atopic) subjects with asthma and (actively sensitized) guinea pigs // *J. Allergy Clin. Immunol.*— 1990.— Vol.85.— P.10—16.
47. Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping // *Science.*— 1989.— Vol.345.— P.1059—1065.
48. Rossier B.C., Canessa C.M., Schild L., Horisberger J.D. Epithelial sodium channels // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*— 1994.— Vol.3, № 5.— P.487—496.
49. Schoumacher R.A., Shoemaker R.L., Halm D.R. et al. Phosphorylation fails to activate chloride channels from cystic fibrosis airway cells // *Nature.*— 1987.— Vol.330.— P.752—754.
50. Schultz S.G. Homocellular regulatory mechanisms in sodium-transporting epithelia: Avoidance of extinction by Flush-through // *Am. J. Physiol.*— 1981.— Vol.241, № 6.— P.F579—F590.
51. Schwiebert E.M., Kizer N., Gruenert D.C., Stanton B.A. GTP-binding proteins inhibit cAMP activation of chloride channels in cystic fibrosis airway epithelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 1992.— Vol.89.— P.10623—10627.
52. Shimura S., Sasaki T., Sasaki H., Takishima T. Chemical properties of bronchorrhea sputum in bronchial asthma // *Chest.*— 1988.— Vol.94, № 6.— P.1211—1215.
53. Sigal O.L., Becker K.L. Arachidonic acid 15-lipoxygenase and airway epithelium // *Am. Rev. Respir. Dis.*— 1988.— Vol.138, № 6.— Pt 2.— P.S35—S40.
54. Tabchrangi J.A., Low D., Elie D., Hanrahan J.W. Low-conductance chloride channel activated by cAMP in epithelial cell line T 84 // *FEBS Lett.*— 1990.— Vol.270.— P.157—164.
55. Welsh M.J. Abnormal regulation of ion channels in cystic fibrosis epithelia // *FASEB J.*— 1990.— Vol.4.— P.2718—2725.
56. Widdicombe J.H., Welsh M.J., Finkbeiner W.E. Cystic fibrosis decreases the apical membrane chloride permeability of monolayers cultured from cells of tracheal epithelium // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 1985.— Vol.82.— P.6167—6171.

57. Wood A.M., Dinh Xuan A.T., Cremona G. et al. The effect of al-adrenergic agonist metoxamine and 'loop' diuretic frusemide reduce nasal potential difference // Eur. Respir. J.— 1991.— Vol.4, № 7.— P.802—806.
58. Zabner J., Couture L.A., Smith A.E., Welsh M.J. Correction of cAMP-stimulated fluid secretion in cystic fibrosis airway epithelia:

efficiency of adenovirus-mediated gene transfer in vitro // Hum. Gene Ther.— 1994.— Vol.5, № 5.— P.585—593.

Поступила 09.07.96.

© ОГОРОДОВА Л.М., 1999

УДК 615.032.23

Л.М.Огородова

СИСТЕМЫ ИНГАЛЯЦИОННОЙ ДОСТАВКИ ПРЕПАРАТОВ В ДЫХАТЕЛЬНЫЕ ПУТИ

Сибирский государственный медицинский университет

В 1997 году врачи России присоединились к Европейскому пульмонологическому сообществу, приняв Российскую программу по бронхиальной астме [1]. В последующем были утверждены протоколы диагностики и лечения астмы. Современная концепция болезни стала широко внедряться в здравоохранение. Однако возникли проблемы с пониманием новых направлений в терапии, преодолением фобии к гормонам. В связи с накоплением новых знаний по фармакокинетике, а также появлением на российском рынке большого числа новых ингаляторов достаточно сложным для врачей оказался вопрос выбора средств доставки лекарств в дыхательные пути. Эта проблема требует в настоящее время дополнительного обсуждения с врачебной аудиторией.

Ингаляционная терапия является главным способом доставки лекарств для подавляющего большинства больных бронхиальной астмой. Ее цель — максимальная доставка препарата в дыхательные пути для обеспечения его местной активности и минимизация побочных эффектов, связанных с его проникновением в системное кровообращение [2,6]. Известно, что первая система ингаляционной доставки была предложена для больных туберкулезом в 1876 году. С этой целью Seeger's создал небулайзер, основанный на испарении лекарства при нагревании раствора. Небулайзер, более близкий по конструкции к современному, появился в 1935 году в США, его использовали для лечения больных с хроническими обструктивными болезнями легких. Подлинный прорыв в повышении эффективности ингаляционной терапии произошел в 1956 году, когда больным был предложен дозированный аэрозольный ингалятор (ДАИ). С этого периода фармацевтические компании направили свои усилия на совершенствование устройств доставки и разработали множество различных ингаляторов, поскольку стало очевидным, что эффективность и безопасность ингаляционных препаратов, помимо их фармакологических свойств, зависит от устройства, обеспечивающего его доставку в дыхательные пути.

В настоящее время все системы доставки препаратов в дыхательные пути можно разделить на три группы:

1. ДАИ	со спейсером, камерой "Легкое дыхание"
2. Порошковые	не содержащие фреона капсульные резервуарные мультидозированные
3. Небулайзеры	струйные ультразвуковые

Для правильного выбора системы доставки необходимо в первую очередь оценить факторы, от которых зависит попадание лекарств из ингалятора в легкие больного — технику ингаляции, скорость выброса препарата, объемную скорость вдоха, объем респираторной фракции (количество частиц препарата размером от 0,5 до 5 мкм в процентах от отгруженной из контейнера ингалятора разовой дозы).

Известно, что, несмотря на популярность ДАИ среди больных бронхиальной астмой [20], благодаря их портативности и доступной цене, воспроизвести правильную технику ингаляции при использовании этого типа ингаляторов могут только 20—40% больных [8,15]. Следствием необходимости строгого соблюдения маневра ингаляции является возрастное ограничение к использованию ДАИ (от 12 до 45 лет) [3]. Ввиду высокой скорости выброса лекарства и оседания его на задней стенке глотки пациента при применении ДАИ отмечается низкий объем респираторной фракции (около 10%) и более высокий риск осложнений, чем при использовании других ингаляторов [6]. Наконец, ДАИ не отвечает условиям экологической безопасности, т.к. для образования и выброса аэрозоля из ингалятора используется фреон, разрушающий озоновый слой атмосферы. Созданные в последние годы безфреоновые ингаляторы не получили еще широкого распространения