

С.Н.Орлов, И.А.Баранова, А.Г.Чучалин

## ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ СИГНАЛИЗАЦИИ И ПАТОЛОГИЯ ЛЕГКИХ.

### I. ГЛАДКОМЫШЕЧНЫЕ КЛЕТКИ

В последние десять—пятнадцать лет достигнут существенный прогресс в выяснении молекулярных механизмов функционирования сигнальных систем клетки, т.е. систем, ответственных за восприятие и проведение гормональных и электрических сигналов от рецепторов на белки-исполнители. Эти системы выполняют ключевую роль в координации работы многоклеточных ансамблей, в том числе такого сложно устроенного органа, каким являются легкие (рис.1). Неудивительно, что даже небольшие (генетически детерминированные или приобретенные благодаря воздействию внешних неблагоприятных факторов) изменения компонентов этих систем приводят к развитию патологических состояний. Эти же системы рассматриваются как основные и наиболее эффективные мишени при разработке новых фармакологических препаратов. В этом обзоре мы постараемся суммировать общие положения и молекулярно-биологические данные о патогенезе и терапии некоторых заболеваний легких, затрагивающих сигнальные системы гладкомышечных клеток и клеток эпителия воздухопроводящих путей. В дальнейшей работе будут рассмотрены данные о клетках эпителия воздухопроводящих путей, альвеолоцитах, макрофагах и клетках крови, вовлеченных в воспалительные реакции.

На рис.2 представлена схема, иллюстрирующая общие принципы восприятия, проведения и усиления сигналов в клетке. В большинстве случаев первые события разворачиваются на уровне плазматической мембраны, где локализованы рецепторы нейромедиаторов и пептидных гормонов ( $R_1$ ). Активированные рецепторы взаимодействуют

с ГТФ-связывающими белками ( $G_p$ ), которые передают информацию на мембранные белки-мишени ( $T_1$ ). В ограниченном числе случаев (постсинаптические Na-каналы, потенциал-оперируемые ионные каналы) рецептор (в данном случае n-холинорецептор и сенсор мембранного потенциала, соответственно) локализован на молекуле  $T_1$  и сигнал передается без участия  $G_p$ . Активированный  $T_1$  контролирует внутриклеточную концентрацию вторичных посредников ( $M$ ), которые в свою очередь модифицируют активность цитоплазматических белков-мишеней ( $T_2$ ). Последние контролируют функциональную активность, воздействуя на белки—исполнители. Ряд соединений (стероидные и тиреоидные гормоны) свободно проникают через цитоплазматическую мембрану, взаимодействуют с цитоплазматическими рецепторами ( $R_2$ ), которые, попадая в ядро, изменяют экспрессию белков, в том числе и тех, которые образуют сигнальную систему. Установлено, что один активированный рецептор может активировать  $10^3$  молекул  $G_p$ . Такой же коэффициент усиления сигнала существует и на остальных этапах проведения сигнала ( $G_p \rightarrow T_1$ ,  $T_1 \rightarrow M$ ,  $M \rightarrow T_2$ ,  $T_2 \rightarrow$  белки-мишени), обеспечивая таким образом колоссальный коэффициент усиления ( $10^6$ — $10^{12}$ ), что не уступает, а зачастую и превосходит коэффициенты усиления современных систем приема радио- и телесигналов. Продолжая эту аналогию, необходимо отметить, что другим достоинством клеточной сигнализации является ее избирательность, т.е. крайне низкое отношение сигнал/шум, на фоне которого ей приходится работать. Специфичность реакции и ее разнообразие определяется следующими факторами:

1) Вариабельностью и стереоспецифичностью рецепторов для целого ряда химических, электрических и тепловых стимулов. Так, только для нейромедиаторов их число достигает 30. Более того, одни и те же стимулы могут взаимодействовать с разными рецепторами и набор этих рецепторов тканеспецифичен. Так, например, к настоящему времени известно около 10 типов рецепторов катехоламинов и 5 типов рецепторов ацетилхолина.

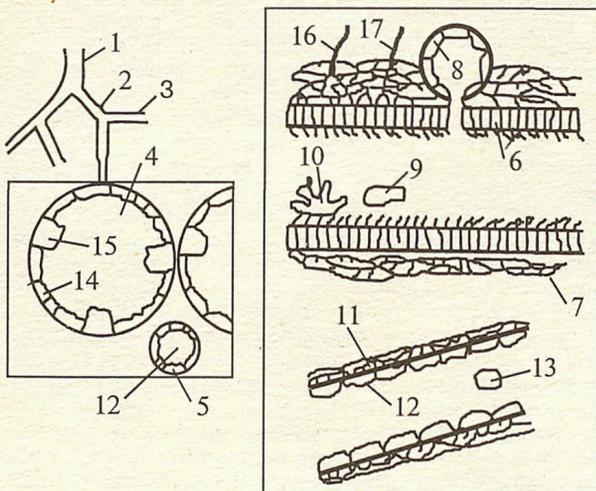


Рис.1. Клетки, вовлеченные в функционирование легких.

1 — трахея; 2 — бронхи; 3 — бронхиолы; 4 — альвеолы; 5 — кровеносные сосуды; 6 — реснитчатый эпителий; 7 — гладкомышечные клетки воздухопроводящих путей; 8 — секреторные клетки подслизистой железы; 9 и 10 — тучная клетка и макрофаг; 11 — гладкомышечные клетки сосудов; 12 — клетки эндотелия; 13 — клетки белой крови, вовлеченные в формирование воспалительной реакции; 14, 15 — альвеолоциты соответственно I и II типов; 16 и 17 — холинергическая и пептидергическая иннервация.

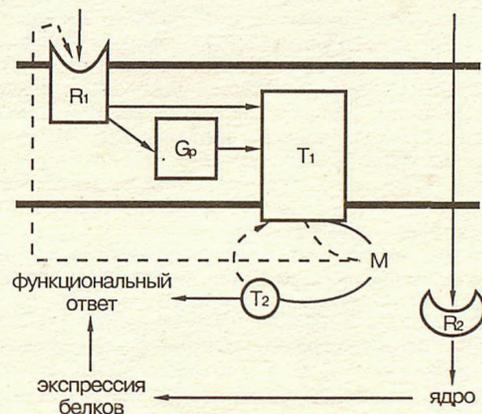


Рис.2. Общая схема основных принципов восприятия, проведения и усиления сигналов в клетке.

$R_1$  — рецептор нейромедиаторов или пептидных гормонов;  $G_p$  — ГТФ-связывающий белок;  $T_1$  — белок-мишень;  $M$  — вторичный посредник;  $T_2$  — цитоплазматический белок-мишень.

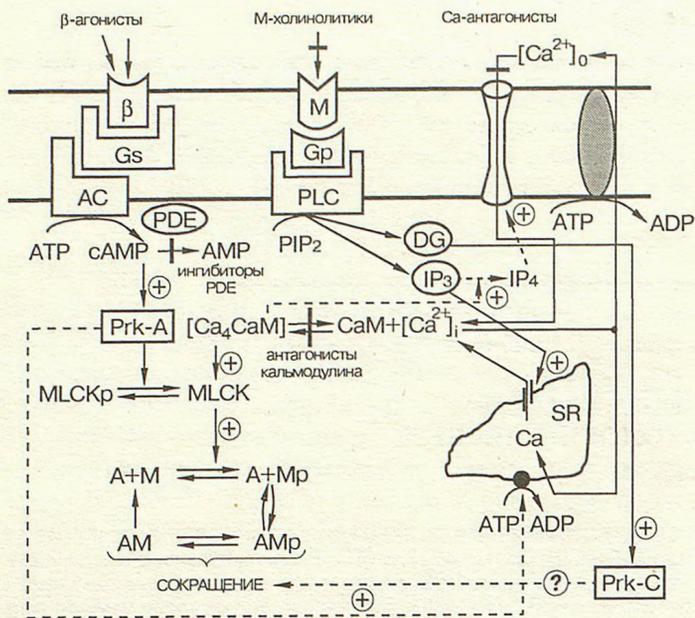


Рис.3. Схема, иллюстрирующая основные пути регуляции сокращения гладкомышечной клетки.

β — β-адренорецептор; AC — аденилатциклаза; M — M-холинорецептор; G<sub>p</sub> — ГТФ-связывающий белок; PLC — фосфолипаза С; PDE — фосфодиэстераза; PIP<sub>2</sub> — трифосфоинозитиды; DG — диацилглицерол; IP<sub>3</sub> — инозитолтрифосфат; IP<sub>4</sub> — инозитол 1,3,4,5-тетрафосфат; Prk-A — протеинкиназа А; CaM — кальмодулин; [Ca<sub>4</sub>CaM] — комплекс кальмодулина и кальция; MLCK — киназа легких цепей миозина; А — актин; М — миозин; SR — саркоплазматический ретикулум; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> — свободный ионизированный кальций; Prk-C — протеинкиназа С.

2) Большим набором G<sub>p</sub>, состоящих из трех субъединиц (α, β, γ). К настоящему времени известно около 20 α субъединиц и 4 типа β и γ субъединиц, что увеличивает общее число комбинаций приблизительно до 300.

3) Разнообразием мишеней M<sub>1</sub>, локализованных в цитоплазме. Например, ионные каналы различаются по селективности, проводимости, чувствительности к изменениям мембранного потенциала и воздействию G<sub>p</sub>. Ферменты имеют большее число изоформ, отличающихся по механизму регуляции их активности (аденилатциклаза — 6, фосфолипаза С — 5, фосфолипаза A<sub>2</sub> — 6 изоформ).

4) Наличием нескольких вторичных посредников, среди которых наиболее полно изучены циклические нуклеотиды (сАМР, сGМР), продукты гидролиза фосфолипидов (инозитолфосфаты и диацилглицерол) и кальций. Кроме того, в последнее время функции вторичных посредников приписываются полифосфоинозитидам (PIP и PIP<sub>2</sub>), лизофосфатидной кислоте, продукту гидролиза сфингомиелина керамида и др. В ряде случаев вторичные посредники диффундируют из клетки и воздействуют на специфические рецепторы, изолированные на этой же или соседних клетках (т.н. короткодистантные гормоны, например, простагландины и лейкотриены, образующиеся при активации фосфолипазы A<sub>2</sub>). Этот механизм, а также другие пути передачи сигнала, обозначенные на рис.2 пунктирными стрелками, образуют сложную тканеспецифичную систему обратных связей, обеспечивающую согласованную работу (cross-talking) сигнальных систем.

В следующих разделах будут рассмотрены специфические особенности сигнальных систем на примере клеток, вовлеченных в функционирование легких. Более детальную информацию по общим вопросам проведения сигналов в клетке читатель может найти в других работах [2,5]. Последние достижения в этой области суммированы в работах [9,17,39].

На рис.3 представлена общая схема, описывающая основные пути регуляции сокращения гладкомышечных клеток, составленная на основании данных обзоров [19,41]. Согласно этой схеме основным триггером сокращения является прирост концентрации свободного ионизированного кальция ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Этот прирост обеспечивается как за счет спонтанной электрической активности клеток, открытия потенциал-управляемых каналов и входа Ca<sup>2+</sup> из внеклеточного пространства, так и за счет высвобождения кальция из саркоплазматического ретикулума (SR). В данном случае сигналом к этому

является высвобождение инозитолтрифосфата (IP<sub>3</sub>) при гидролизе трифосфоинозитидов (PIP<sub>2</sub>) специфической фосфолипазой С (PLC). В свою очередь PLC связана с целым спектром рецепторов (в данном случае приведен M-холинорецептор). В большинстве случаев эта связь опосредована через G<sub>i</sub> или неидентифицированные GTP-связывающие белки (G<sub>p</sub>). Согласно последним данным, IP<sub>3</sub> фосфорилируется CaM-зависимой киназой до инозитол 1,3,4,5-тетрафосфата (IP<sub>4</sub>), и это соединение может приводить к открытию Ca<sup>2+</sup>-каналов плазматической мембраны. При увеличении Ca<sup>2+</sup> в диапазоне от 10<sup>-7</sup> до 10<sup>-6</sup> происходит его связывание с универсальной цитоплазматической мишенью — кальмодулином (CaM) и активация киназы легких цепей миозина (MLCK). Именно этот фермент, осуществляя фосфорилирование миозина (М), инициирует его взаимодействие с актином (А) и сокращение ГМК. Другой продукт гидролиза PIP<sub>2</sub> фосфолипазой С диацилглицерол является мощным активатором протеинкиназы С. Механизм вовлечения этого фермента в регуляцию сокращения ГМК до сих пор не установлен [6].

В соответствии со схемой на рис.3 выделяются следующие основные пути расслабления гладкомышечных клеток:

- Уменьшение концентрации Ca<sup>2+</sup> за счет функционирования Ca<sup>2+</sup>-АТФазы и Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обменника сарколеммы и Ca<sup>2+</sup>-АТФазы саркоплазматического ретикулума.
- Уменьшение сродства MLCK к Ca<sub>4</sub>...CaM за счет фосфорилирования фермента.

Приведенная здесь схема объясняет и механизм действия основных классов лекарственных препаратов, используемых в качестве бронхолитиков или рассматриваемых как потенциально перспективные в этом плане соединения. Это особенно важно в терапии бронхообструктивных заболеваний и, прежде всего, бронхиальной астмы. Антагонисты M-холинорецепторов блокируют действие ацетилхолина на фосфолипазу С, снижая тем самым уровень фосфоинозитидного ответа и прироста [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Агонисты β-рецепторов (β) вызывают активацию аденилатциклазы (AC) через G<sub>s</sub>-белок и прирост сАМР. Этот вторичный посредник в свою очередь активирует протеинкиназу А (Prk-A), которая, фосфорилируя MLCK, уменьшает ее сродство к комплексу Ca<sub>4</sub>...CaM. Предполагается, что протеинкиназа А (Prk-A), фосфорилируя специфический белок фосфоламбан, увеличивает активность Ca<sup>2+</sup>-АТФазы саркоплазматического ретикулума. Ингибиторы фосфодиэстеразы (PDE) препятствуют быстрому падению уровня сАМР в клетке. Антагонисты кальмодулина препятствуют образованию активной конформации комплекса Ca<sub>4</sub>...CaM, а кальциевые антагонисты — входу Ca<sup>2+</sup> через потенциалуправляемые кальциевые каналы.

Слабым местом такого рода схем является то обстоятельство, что они построены, как правило, на основании синтеза данных, полученных для разного типа клеток. Так, например, данные о модификации активности MLCK протеинкиназой А в наиболее полной мере разработаны только для гладкой мускулатуры желудка птиц. Сведения об участии протеинкиназы А в регуляции активности Ca<sup>2+</sup>-насоса саркоплазматического ретикулума получены на кардиомиоцитах. Данные о кинетических характеристиках формирования фосфоинозитидного ответа в гладкомышечных клетках воздухопроводящих путей (ГМК ВП) ограничены единичными сообщениями. Это замечание особенно существенно при анализе путей фармакологической регуляции гладкомышечных клеток, характеризующихся крайне высокой тканевой и видовой специфичностью. Следует особо отметить, что именно знание особенностей принципов функционирования клеток специализированной ткани позволяет создать тропные к ней фармакологические препараты, обладающие минимумом побочных действий. Поясним это на примере прогресса, достигнутого в последние годы при выяснении механизма действия имеющихся бронхолитиков и создания новых лекарственных препаратов.

Гладкомышечные клетки воздухопроводящих путей большинства млекопитающих, в том числе и человека [43] (из распространенных экспериментальных животных исключение составляет морская свинка [12]), лишены спонтанной электрической активности и осцилляций мембранного потенциала, вызванного распространением потенциала действия. Это означает, что, несмотря на существование в ГМК ВП потенциалуправляемых Ca<sup>2+</sup>-каналов (это положение подтверждено в экспериментах по связыванию меченых Ca<sup>2+</sup>-антагонистов), эти каналы не будут вносить существенного вклада в общую величину входящего потока кальция за счет сохранения мембранного потенциала на уровне, обеспечивающем поддержание этих каналов в закрытом состоянии. По всей видимости, именно этим объясняется тот факт, что в отличие от патологии сердечно-сосудистой системы и, в частности, гипертонической болезни, органические антагонисты Ca<sup>2+</sup> (производные верапамила, дилтиазема и дигидропиридинов) не получили широкого распространения в терапии бронхиальной астмы [7].

Таблица 1

Влияние изопреналина, каталитической субъединицы протеинкиназы А и окадевой кислоты на кинетические характеристики  $K^+$ -каналов гладкой мускулатуры трахеи кролика [30]

Соединение	Вероятность нахождения канала в открытом состоянии
Контроль	0,012±0,004
Изопреналин ( $2 \cdot 10^{-7}$ М)	0,08±0,02
Изопреналин + окадевая кислота ( $10^{-5}$ М)	0,19±0,08
Протеинкиназа А — 10 ЕД/мл (каталитическая субъединица)	0,033±0,006
Протеинкиназа А (10 ЕД/мл) + окадевая кислота ( $10^{-5}$ М)	0,23±0,05

В этой связи особое внимание привлекают исследования, посвященные механизмам регуляции потенциала сарколеммы ГМК ВП. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что решающая роль в этом процессе принадлежит высокой калиевой проводимости. Так, было обнаружено, что неспецифический ингибитор  $K^+$ -каналов тетраэтиламоний (ТЭА) вызывает появление спонтанной электрической активности и сокращение ГМК ВП [25,27,36]. В этой связи гиперполяризующее действие  $\beta$ -агонистов и ингибиторов фосфоэстеразы [14,21] можно рассматривать как опосредованное через увеличение проводимости  $K^+$ -каналов.

Сравнительно недавно это положение нашло подтверждение в экспериментах по регистрации одиночной проводимости каналов. Было установлено, что  $\beta$ -агонисты увеличивают вероятность нахождения  $K^+$ -каналов в открытом состоянии. Этот эффект модулировался добавлением каталитической субъединицы протеинкиназы А и ингибитора фосфопротеинфосфатаз—окадевой кислоты (табл.1). Позднее было установлено, что увеличение  $K^+$ -проводимости наблюдается после добавления негидролизуемых аналогов GTP, которые потенцируют действие  $\beta$ -агонистов, что указывало на участие в этом процессе ГТФ-связывающих белков. В самом деле, открытие  $K^+$ -каналов наблюдалось при добавлении  $G_s$  или его  $\alpha$ -субъединицы в комплексе с ГТФ, но не с ГДФ [28]. В ГМК ВП обнаружено три типа  $K^+$ -каналов: потенциал-управляемые  $K^+$ -каналы,  $K^+$ -каналы большой проводимости,  $K^+$ -каналы, активируемые харидотоксином (ChTX), а также  $K^+$ -каналы, время нахождения которых в открытом состоянии резко возрастает при падении внутриклеточной концентрации АТФ. Эти каналы ингибируются глбенкламидом (*glibenclamide*) и активируются никорандилом (*nicorandil*), кромокалимом (*cromocalim*), пинацидилом (*pinacidil*) и апикалимом (*apikalim*, или соединение RP 52891) [11,13].

Следующие данные свидетельствуют о том, что действие  $\beta$ -рецепторов и системы сАМР связано с активностью  $Ca^{2+}$ -зависимых  $K^+$ -каналов большой проводимости, содержание которых в ГМК ВП наиболее велико [15,33].

1) Действие  $\beta$ -агонистов, каталитической субъединицы протеинкиназы А и  $G_s$  на  $K^+$ -проводимость наблюдалось только при наличии в растворе, омывающем внутреннюю поверхность мембраны, микромолярных концентраций  $Ca^{2+}$  [28,30].

2) Расслабляющее действие умеренных концентраций  $\beta$ -агонистов на тонус ГМК ВП морской свинки и человека, предварительно обработанных ацетилхолином, уменьшалось в присутствии ChTX, но не ингибитора АТФ-чувствительных  $K^+$ -каналов или апамина (ингибитора  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов средней проводимости) [24,35]. В этих же работах установлено, что ингибирующий эффект ChTX ослабевал по мере концентрации  $\beta$ -агониста, был относительно невелик при использовании ингибиторов фосфодиэстеразы и не был отмечен, когда расслабление ГМК осуществлялось за счет введения активатора АТФ-чувствительных  $K^+$ -каналов.

Высвобождение ацетилхолина из нервных окончаний парасимпатической нервной системы играет центральную роль в сокращении гладкомышечных клеток, в том числе и ВП. Тем не менее, как уже отмечалось выше, последовательность событий, приводящих к сокращению ГМ ВП при активации М-холинорецепторов, до сих пор не установлена.

Было выявлено, что ацетилхолин, действуя через М-холинорецепторы, уменьшает время нахождения  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов в открытом состоянии. Действие агонистов М-холинорецепторов усиливалось в присутствии ГТФ и блокировалось ГДФ, а также коклюшным токсином [28,29]. Известно, что при действии коклюшного токсина происходит АДФ-рибозилирование целого семейства G-белков, отличающихся своей  $\alpha$ -субъединицей (т.н.  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_o$  и  $G\alpha_q$  ГТФ-связывающие белки). Тем не менее ни  $\alpha_i$ , ни  $\alpha_o$  субъединицы не вызвали ингибирования Са-активируемых  $K^+$ -каналов ГМК ВП [28]. Трудно предположить, что в этом процессе вовлечена  $\alpha_i$  субъединица, до сих пор обнаруживаемая только в наружных сегментах палочек сетчатки. В этой связи можно предположить, что действие М-холинолитиков на  $Ca^{2+}$ -активируемые  $K^+$ -каналы либо опосредовано через новый класс  $\alpha$ -субъединиц, чувствительных к коклюшному токсину, либо в этом взаимодействии участвуют также  $\beta$  и  $\gamma$  субъединицы.

Приведенные здесь сведения позволяют предположить следующую схему регуляции  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов при действии агонистов  $\beta$ -адрено- и М-холинорецепторов (рис.4). Агонисты М-холинорецепторов приводят к высвобождению кальция из внутриклеточных депо и входу  $Ca^{2+}$  через рецепторуправляемые каналы, открываемые либо в ответ на повышение  $[Ca^{2+}]_i$ , либо за счет продукции  $IP_4$ . Открытие низкоселективных рецепторуперируемых  $Ca^{2+}$ -каналов стремится вызвать деполяризацию мембраны. Деполяризация мембраны препятствует выходу калия через каналы, открывающиеся в ответ на повышение  $[Ca^{2+}]_i$ . Сравнительно недавно это было убедительно продемонстрировано нами в экспериментах на эритроцитах человека и полосках гладкой мускулатуры мочеочника, где транзиторный гиперполяризационный ответ также связан с активацией  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $K^+$ -каналов [1]. Как уже отмечалось выше, сарколемма ГМК ВП обогащена высокопроводящими  $Ca^{2+}$ -активируемыми  $K^+$ -каналами, блокируемыми ChTX, которые препятствуют деполяризации мембраны и входу  $Ca^{2+}$  через рецепторуправляемые каналы, блокируемые органическими антагонистами  $Ca^{2+}$ . Тем не менее такая возможность, по-видимому, реализуется в силу ингибирования М-холинорецепторами через неидентифицированный  $G_p$ -белок, блокируемый коклюшным токсином,  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов. Гиперполяризующее действие агонистов  $\beta$ -рецепторов связано как с непосредственным стимулирующим действием активированного  $G_s$  белка на  $K^+$ -каналы (т.н. "membrane-limited" механизм), так и через активацию аденилатциклазы, протеинкиназы А и фосфорилирование неидентифицированного белка или, возможно, непосредственно каналоформера. Можно предположить, что второй механизм играет центральную роль в расслаблении ГМК ВП при повышении концентрации  $\beta$ -агониста.

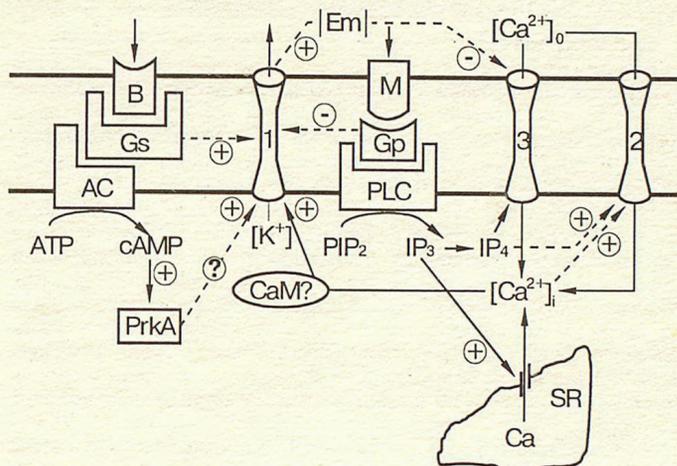


Рис.4. Схема вовлечения  $\beta$ -адренергических и m-холинергических рецепторов в регуляцию мембранного потенциала (Em) и проводимости  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов (1), рецепторуправляемых (2) и потенциалуправляемых (3) Са-каналов в сарколемме гладкомышечных клеток воздухопроводящих путей.

b —  $\beta$ -адренорецептор; AC — аденилатциклаза; M — М-холинорецептор;  $G_p$  — ГТФ-связывающий белок; PLC — фосфолипаза С;  $PIP_2$  — трифосфоинозитиды;  $IP_3$  — инозитолтрифосфат;  $IP_4$  — инозитол 1, 3, 4, 5-тетрафосфат; Prk-A — протеинкиназа А; SR — саркоплазматический ретикулум;  $[Ca^{2+}]_i$  — свободный ионизированный кальций.

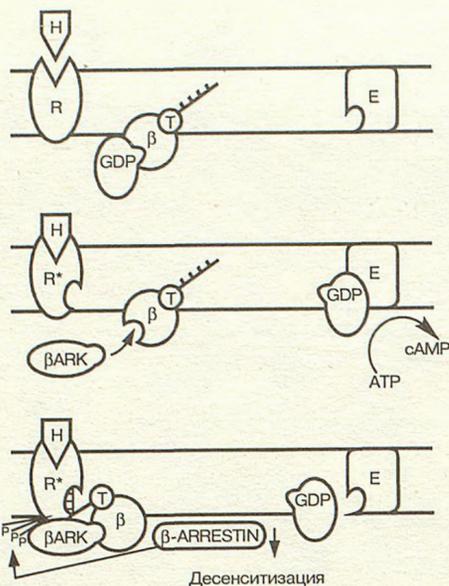


Рис.5. Схематическое представление возможного механизма инактивации β-адренорецептора G<sub>p</sub>-связанной киназой рецептора. Пояснения см. в тексте.

H—гормон или агонист лиганда; K — β-адренергический рецептор α, β и γ субъединицы гетеротримерных G-протеинов; E — эффекторный фермент аденилатциклаза; RK — родопсин киназа; волнистая линия — пренильная группа γ-субъединицы.

Рассмотренные выше результаты исследований намечают новые подходы фармакологической коррекции бронхоконстрикции, а также заставляют по-новому взглянуть на традиционно развиваемые направления. Проиллюстрируем это положение некоторыми примерами, ограничиваясь только рассмотрением взаимодействия лекарственных препаратов с ГМК. Возможные побочные эффекты, связанные с воздействием этих средств на клетки эпителия воздухопроводящих путей, альвеолоциты, макрофаги и нейтрофилы, будут рассмотрены нами в других частях нашего обзора.

## 1. Существующие подходы

### 1. β-агонисты

β-агонисты остаются пока наиболее широко используемыми и эффективными бронходилататорами в клинической практике. Механизм их действия на гладкую мускулатуру ВП уже рассмотрен нами подробно выше. Надежды в развитии этого направления связывались с созданием высокоселективных агонистов β-рецепторов ГМК ВП и β-агонистов пролонгированного действия.

Однако достижение архиселективности вряд ли целесообразно для клинического использования, поскольку ингаляционное введение уже имеющихся препаратов обеспечивает бронходилатирующий эффект на 90—95%, а побочные эффекты (тремор, тахикардия, гипокалиемия) опосредуются, как правило, через β<sub>1</sub>-рецепторы. Что же касается пролонгированности, то она оправдана лишь в том случае, если не приводит к развитию так называемого феномена *down-regulation* (уменьшение числа β-рецепторов в ответ на пролонгированность действия) и достигается за счет снижения дозы β<sub>2</sub>-агониста.

Классический механизм десенситизации рецепторов, взаимодействующих с G<sub>s</sub> белками, опосредован через фосфорилирование α-субъединицы G<sub>p</sub> различными типами протеинкиназ, в том числе протеинкиназой А. Для β<sub>2</sub>-адренорецепторов этот механизм детально рассмотрен в обзоре [20]. Из сказанного выше следует, что использование ингибиторов этого фермента для предотвращения *down-regulation* β-рецепторов нежелательно, т.к. этот же фермент вовлечен в регуляцию сродства MLCK к Ca<sup>2+</sup>...CaM. Сравнительно недавно было, однако, обнаружено наличие особого класса киназы, взаимодействующих с G<sub>p</sub> и избирательно фосфорилирующих β-адренорецепторы. Наиболее полно изучен этот механизм на примере киназы β-адренорецепторов, получившей название βARK<sub>1</sub>. Современные сведения о механизме работы этого фермента приведены на рис.5. Центральным моментом этой модели является взаимодействие βARK<sub>1</sub> с β-димером, после чего фермент способен фосфо-

рилизовать β-рецепторы и вызывать их последующее взаимодействие с белком-ингибитором β-аррестином [31]. В бесклеточных системах βARK<sub>1</sub> ингибируется гепарином. Фармакологические подходы модификации βARK<sub>1</sub> в интактной клетке не разработаны.

Наиболее важным событием последних лет явилось создание ингалярованных β<sub>2</sub>-агонистов пролонгированного действия, таких как салметерол (*salmeterol*) и формотерол (*formoterol*), обеспечивающих бронходилатацию и предупреждение бронхоконстрикции более чем на 12 часов [32]. Клинические исследования показали, что оба этих препарата высокоэффективны и не имеют побочных эффектов. Не описано появление толерантности к бронходилатирующему действию препаратов [26,45], а толерантность на защиту от бронхоконстрикторных влияний описана в небольшом количестве наблюдений [7]. В свете модели, изображенной на рис.4, это особенно важно, так как на стадии профилактики, когда синдром бронхоспазма еще не выражен, электрическую активность можно поддерживать низкими концентрациями β<sub>2</sub>-агониста, которые гиперполяризуют мембрану через "membrane-limited" механизм и не вызывают существенного прироста cAMP с последующей интернализацией β-рецепторов.

### 2. Теофиллин и родственные соединения

Действие этих соединений как бронходилататоров связывалось с ингибированием фосфодиэстеразы ГМК и повышением уровня cAMP. В этой связи изучалось распространение различных изоформ фосфодиэстеразы в ГМК ВП и поиск их селективных ингибиторов, как, например, ингибитор III изоформы фермента соединение SK&F 94836 [44]. Исследования последних лет позволили предположить, что в гладкой мускулатуре дыхательных путей человека активны II, III, IV и V изоформы фосфодиэстеразы и что их ингибиторы могут быть бронходилататорами *in vitro* [7].

Теофиллин в настоящее время рассматривается как неселективный ингибитор фосфодиэстеразы. Материалы, представленные в табл.2, показывают, что относительное участие ингибиторов фосфодиэстеразы в регуляции мембранного потенциала ГМК ВП относительно невелико. В самом деле, как видно из табл.2, ЕС 50 для расслабляющего действия изопротеренола на контрактуру ГМК ВП человека увеличивается примерно в 5 раз в присутствии харибдотоксина (ChTX). Этот результат иллюстрирует рассмотренные выше данные электрофизиологических экспериментов, показывающих роль открытия Ca<sup>2+</sup>-активируемых K<sup>+</sup>-каналов в механизме бронхорасширяющего действия β-агонистов. Из этой же таблицы видно, что эффективность теофиллина как бронходилататора на 4 порядка ниже, чем β-агонистов, и относительно слабо уменьшается в присутствии ChTX. Ранее было установлено, что другое соединение, форсколин, резко повышающее cAMP за счет непосредственной активации аденилатциклазы (т.е. минуя стадию активации G<sub>s</sub>), также оказывается малоэффективным расслабляющим агентом ГМК ВП *in vitro* [46]. В этой связи можно предположить, что основной мишенью теофиллина при терапии бронхиальной астмы являются клетки, отличные от гладкомышечных. В самом деле, в настоящее время широко обсуждается вопрос об участии этих препаратов в подавлении воспалительной и аллергической реакции (подробнее см. [7]).

В литературе дискутируется вопрос о совместном использовании β<sub>2</sub>-агонистов и производных теофиллина для купирования приступов удушья. Теоретической предпосылкой является гипотеза о пролонгировании прироста cAMP, вызванного активацией β-рецепторов. Эта гипотеза в свою очередь основывается на предпосылке о ключевой роли фосфодиэстеразы в нормализации уровня внутриклеточного cAMP в ответ на действие активатора аденилатциклазы. Следует, однако, отметить, что в последнее время эта концепция, высказанная первооткрывателем системы циклического AMP Сюзер-

Т а б л и ц а 2

**Влияние харибдотоксина (ChTX) на расслабление гладкомышечных клеток бронхов человека, индуцированное изопротеренолом и теофиллином [35]**

Препараты	ЕС 50 (мкМ)	
	-ChTX	+ChTX
Изопротеренол	0,0046	0,019
Теофиллин	32	71

ландом [42], претерпела существенные изменения. Так, по крайней мере для клеток гладкой мускулатуры сосудов было установлено, что основной причиной нормализации уровня сАМР является его транспорт из клетки через плазматическую мембрану [18,38]. Механизм транспорта циклических нуклеотидов из клеток до сих пор не установлен. Решение этой проблемы, наряду с созданием веществ, регулирующих активность этой системы, открывает новые перспективы терапии бронхиальной астмы.

### 3. Холинолитики

Из рис.4 следует, что одними из наиболее мощных бронхолитиков должны быть антагонисты М-холинорецепторов и особенно  $M_3$ -холинорецепторов, локализованных на сарколемме ГМК ВП. Последнее обстоятельство особенно важно в связи с тем, что  $M_1$ - и  $M_2$ -холинорецепторы расположены на ганглиях, а  $M_2$ -рецепторы — на пресинаптической мембране нервных окончаний парасимпатической системы [22]. Стимуляция  $M_1$ -рецепторов ведет к увеличению высвобождения ацетилхолина из нервных окончаний, а  $M_2$ -рецепторы — напротив, к ингибированию этого процесса. Антагонист М-холинорецепторов ипратропиум бромид не различает указанные выше подтипы рецепторов, в связи с чем трудно предсказать его конечный эффект. В этой связи желательно иметь специфические антагонисты  $M_3$ - и  $M_2$ -рецепторов. Однако, учитывая особенности структуры холинорецепторов, такая задача кажется трудноразрешимой [22].

## II. Новые подходы

### 1. $Ca^{2+}$ -антагонисты

Как уже отмечалось выше, эти соединения должны проявлять свое бронхорасширяющее действие на фоне частичной деполяризации и появления спонтанной электрической активности ГМК. Такая ситуация ожидается в условиях повышенной активности парасимпатической иннервации. Так как высокоселективные антагонисты  $M_3$ -рецепторов отсутствуют, нам представляется эффективным использование Са-антагонистов на фоне неселективных антагонистов М-холинорецепторов. Многообещающим является также создание соединений, блокирующих рецепторуправляемые  $Ca^{2+}$ -каналы. В настоящее время такие соединения находятся в начальной стадии преclinical испытаний [37].

### 2. Антагонисты кальмодулина

К настоящему времени имеется достаточное количество соединений, высокоселективно взаимодействующих с комплексом  $Ca^{2+}$ -кальмодулин. В качестве контроля в этих экспериментах используют близкородственные  $Ca^{2+}$ -связывающие белки, и прежде всего тропонин С [2]. Тем не менее такой подход нам кажется малоперспективным. Кальмодулин (СаМ) является универсальным связывающим белком, в силу чего использование его антагонистов может сопровождаться сильным побочным цитотоксическим действием. Кроме того, в эритроцитах [3,4] и клетках некоторых других тканей антагонисты СаМ блокируют открытие  $Ca^{2+}$ -активированных  $K^+$ -каналов и связанный с этим гиперполяризационный ответ. Если СаМ также вовлечен в функционирование высокопроницаемых  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов ГМК ВП, то от использования его антагонистов можно ожидать двоякого эффекта: расслабление за счет ингибирования киназы легких цепей миозина (см. рис.3) и развитие контрактуры при ингибировании  $Ca^{2+}$ -индуцированной проводимости и реполяризации ГМК (см. рис.4).

### 3. Активаторы $K^+$ -каналов

К настоящему времени расслабляющее действие этих соединений на ГМК ВП надежно установлено только в опытах *in vitro* [10,12]. *In vitro* эффект активаторов  $K^+$ -каналов гораздо слабее [7], что, возможно, связано с тем, что используемые в настоящее время соединения открывают только один тип  $K^+$ -каналов, а именно,  $K^+$ -каналы, чувствительные к АТР. Первоначально эти каналы были обнаружены в островковых клетках поджелудочной железы и их блокирование толбутамидом или глибенкламидом, приводящее выбросу инсулина, до сих пор является одним из основных методов терапии инсулиннезависимой формы диабета. Из данных, представленных на рис.6, видно, что в миоцитах эти каналы в контрольных условиях (кривая 1) находятся в открытом состоянии при концентрации  $[ATP]_i < 2 \cdot 10^{-4}$  М. Активаторы АТР-чувствительных  $K^+$ -каналов (в данном случае RP 49359) уменьшают средство этих каналов к АТР, и их частичное открытие наблюдается при  $[ATP]_i < 1-2 \cdot 10^{-3}$  М. Следует, однако, отметить, что именно в этом диапазоне находится концентрация АТР в ГМК, а потому действие такого рода соединений может быть эффективно только в случае частично ишемизированных тканей. Не исключено, что в ряде случаев расслабляющее действие соединений, открывающих АТР-чувствительные  $K^+$ -каналы, вовсе не связано с этими каналами и реполяризацией клеток. Подробнее этот вопрос рассмотрен в работе [40]. Специфи-

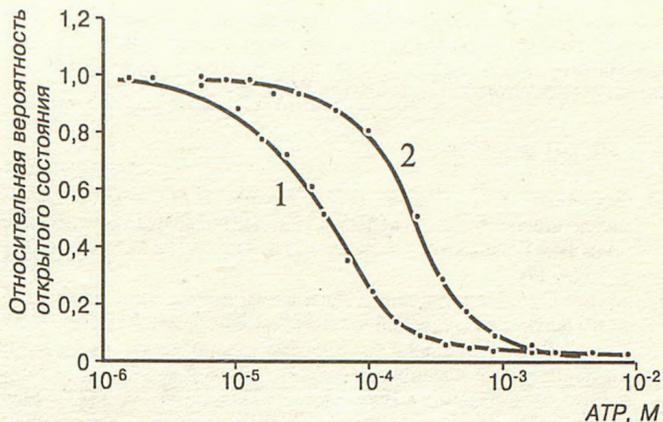


Рис.6. Зависимость проводимости АТР-чувствительных  $K^+$ -каналов сарколеммы кардиомиоцитов от концентрации АТР (inside-out-patch-clamp) [13]. 1 — контроль, 2 — +30 иМ RP 49359.

ческие активаторы  $Ca^{2+}$ -активированных  $K^+$ -каналов, вносящих основной вклад в формирование мембранного потенциала ГМК ВП в условиях действия возбуждающих стимулов, до сих пор не обнаружены, если не считать одиночной работы, появившейся в момент подготовки нашего обзора к публикации [34].

### 4. Соединения, повышающие уровень сГМР

Нитропруссид и другие соединения, активирующие растворимую форму гуанилатциклазы, оказывают мощное расслабляющее действие на ГМК ВП экспериментальных животных *in vitro* [16]. Данные об эффективности этих соединений при бронхиальной астме противоречивы [7]. Совсем недавно были получены данные, свидетельствующие о том, что NO может выступать в роли нейромедиатора некоторых систем иннервации ВП [8]. В этой связи перспективным может оказаться использование атриального натрийуретического фактора (АНФ) и других родственных ему пептидных регуляторов мембраносвязанной формы гуанилатциклазы. Прогресс в этом направлении существенным образом зависит от выяснения механизма расслабляющего действия активаторов гуанилатциклазы на ГМК ВП. К настоящему времени этот вопрос фактически не изучен. Не ясным остаются и следующие его аспекты:

- 1) В отличие от агонистов  $\beta$ -рецепторов расслабляющее действие активаторов растворимой гуанилатциклазы на ГМ ВП уменьшается по мере продвижения от трахеи к бронхам [16].
- 2) АНФ в концентрации  $10^{-8}-10^{-7}$  М вызывает полное расслабление ГМ трахеи крупного рогатого скота после воздействия холиномиметиков, но не влияет на контрактуру, вызванную  $K^+$ -деполяризацией [23]. Не исключено, что этот эффект связан с ингибированием сГМФ-зависимой формой протеинкиназы передачи сигнала от  $M_3$ -холинорецепторов на полифосфоинозитид-специфичную форму фосфолипазы С. В этом случае в плане фармакологии представляется интересным сопоставление эффективности этого механизма гашения сигнала по отношению к другим формам протеинкиназы.
- 3) Модуляторы взаимодействия G-белков с рецепторами и белками-исполнителями

Эти соединения должны модифицировать эффективность проведения сигнала на самых ранних стадиях. Как показали последние исследования, результаты которых рассмотрены нами выше, именно эти стадии оказывают наиболее существенное влияние на формирование электрической активности ГМК ВП, осуществляя контроль проводимости  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов агонистами  $\beta_2$ -адренорецепторов и  $M_3$ -холинорецепторов. В первом случае центральная роль принадлежит  $\alpha$ -субъединице  $G_s$ -белка, освобождающейся в комплексе в ГТФ после взаимодействия с  $\beta$ -рецепторами. Эта реакция инактивируется во времени за счет ГТФ-азной активности  $\alpha$ -субъединицы, ингибируемой холерным токсином, катализирующим ее АДФ-рибозилирование. Трансдукция сигнала от  $M_3$ -рецептора опосредована G-белком, инактивирующимся при реакции АТР-рибозилирования, катализируемых коклюшным токсином. Быстрый прогресс в области клонирования генов различных субъединиц и в применении нуклеотидов, избирательно блокирующих транскрипцию индивидуального белка, позволяют с уверенностью говорить, что субъединицы G-белков, вовлеченные в это взаимодействие, будут идентифицированы в самое ближайшее время. Гораздо более сложная задача — научиться избирательно модифицировать взаимо-

действие данных субъединиц  $G_p$  с белками-исполнителями. Можно, однако, с уверенностью сказать, что именно этот подход позволит разработать новые эффективные пути контроля функциональной активности клеток, в т.ч. и клеток ГМК ВП.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Баскаков М.Б., Орлов С.Н., Агнаев В.М. и др. Высоко-селективный хелатор кальция (квин 2) подавляет активацию кальцием  $K^+$ -каналов // Биол. мембраны.— 1989.— Т.6, № 2.— С.167—176.
2. Орлов С.Н. Кальмодулин (Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии. Т.8)— М.: ВИНТИ, 1987.
3. Орлов С.Н., Кравцов Г.М. Участие кальмодулина в регуляции электрического потенциала плазматической мембраны внутриклеточным кальцием // Биохимия.— 1983.— Т.48.— С.1447—1455.
4. Орлов С.Н., Покудин Н.И., Агнаев В.М. Блокатор кальмодулин-зависимых реакций (R 24571) подавляет активацию кальцием калиевых каналов и не влияет на активность Са-насоса эритроцитов // Докл. АН СССР.— 1989.— Т.304.— С.213—216.
5. Ткачук В.А. Введение в молекулярную биологию.— М.: Изд-во МГУ, 1983.
6. Andrea J.A., Walsh M.P. Protein kinase C of smooth muscle // Hypertension.— 1992.— Vol.20.— P.585—595.
7. Barnes P.J. New drugs in asthma // Eur. Respir. J.— 1992.— Vol.5.— P.1126—1136.
8. Belvisi M.J., Stretton C.D., Barnes P.J. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in human airways // Eur. J. Pharmacol.— 1992.— Vol.210.— P.221—222.
9. Berridge M.J. Inositol triphosphate and calcium signalling // Nature.— 1993.— Vol.361.— P.315—325.
10. Black J.L., Armour C.L., Johnson P.R.A. et al. The action of potassium channel activator BRL 38227 (Iemakalim) on human airway smooth muscle // Am. Rev. Respir. Dis.— 1990.— Vol.142.— P.1384—1389.
11. Black J.L., Barnes P.J. Potassium channels and airway function: a new therapeutic approaches // Thorax.— 1990.— Vol.45.— P.213—218.
12. Clark L.A., Small R.C. Simultaneous recording of electrical and mechanical activity from smooth muscle from guinea-pig isolated trachea (abstr.) // J. Physiol. (Lond.).— 1979.— Vol.300.— P.5P.
13. Escande D., Cavera I.  $K^+$ -channel openers and natural cardioprotection // Trends Pharmacol. Sci.— 1992.— Vol.13.— P.269—271.
14. Fredholm B.B., Brodin K., Stantberg K. On the mechanism of relaxation of tracheal muscle by theophylline and other cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors // Acta Pharmacol. Toxicol.— 1979.— Vol.45.— P.336—344.
15. Green K.A., Foster R.W., Small R.C. A patch-clamp study of  $K^+$ -channel activity in bovine isolated tracheal smooth muscle cells // Br. J. Pharmacol.— 1991.— Vol.102.— P.871—878.
16. Gruetter C.A., Childers C.C., Bosserman M.K. Comparison of relaxation induced by glycerol trinitrate, isosorbide dinitrate and sodium nitroprusside in bovine airways // Am. Rev. Respir. Dis.— 1989.— Vol.139.— P.1192—1197.
17. Hamet P., Orlov S.N., Tremblay J. Intracellular signalling in hypertension // Hypertension / Eds J.H.Laragh, B.M.Brenner. 2-nd Ed.— New York: Raven Press, 1994.— P.634—667.
18. Hamet P., Pang S.C., Tremblay J. Atrial natriuretic factor-induced aggression of cGMP in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells // J. Biol. Chem.— 1989.— Vol.264.— P.12364—12369.
19. Hartshome D.S., Kawanura T. Regulation of contraction-relaxation in smooth muscle // NIPS.— 1992.— Vol.7.— P.59—64.
20. Hausdorff W.P., Caron M.G., Lefkowitz R.J. Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function // FASEB J.— 1990.— Vol.4.— P.2881—2889.
21. Honda K., Satake T., Takagi K., Tomita T. Effect of relaxant on electrical and mechanical activities in guinea-pig trachea muscle // Br. J. Pharmacol.— 1986.— Vol.87.— P.665—671.
22. Hulme E.C., Birdsall N.J.M., Buckley N.J. Muscarinic receptor subtypes // Am. Rev. Pharmacol.— 1990.— Vol.30.— P.633—673.
23. Ishi K., Murad F. ANF relax bovine tracheal smooth muscle and increase cGMP // Am. J. Physiol.— 1989.— Vol.256.— P.C495—C500.
24. Jones T.R., Charette L., Garcia M.L., Kaczorowski G.J. Selective inhibition of relaxation of guinea-pig trachea by charybdotoxin, a potent  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$ -channel inhibitor // J. Pharmacol. Ther.— 1990.— Vol.255.— P.697—706.
25. Kannan M.S., Jager L.P., Daniel E.E., Garfield R.E. Effect of 4-aminopyridine and tetraethylammonium chloride on the electrical activity and cable properties of canine tracheal smooth muscle // Ibid.— 1983.— Vol. 227.— P.706—715.
26. Kesten S., Chapman K.R., Broder I. et al. A 3 month comparison of twice daily inhaled albuterol in the management of stable asthma // Am. Rev. Respir. Dis.— 1991.— Vol.144.— P.622—625.
27. Kroeger E.A., Stephens N.L. Effect of tetraethylammonium on tonic airway smooth muscle: initiation of phasic electrical activity // Am. J. Physiol.— 1975.— Vol.228.— P.633—636.
28. Kume H., Graziano M.P., Kotlikoff M.I. Stimulatory and inhibitory regulation of calcium-activated potassium channels by guanine nucleotide-binding proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1992.— Vol.89.— P.11051—11055.
29. Kume H., Kotlikoff M.I. Muscarinic inhibition of single K channels in smooth muscle cells by a pertussis-sensitive G-protein // Am. J. Physiol.— 1991.— Vol.261.— P.C1204—C1209.
30. Kume H., Takai A., Tokuno H., Tomita T. Regulation of  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$ -channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation // Nature.— 1989.— Vol.341.— P.152—154.
31. Lefkowitz R.L. G-protein coupled receptor kinases // Cell.— 1993.— Vol.74.— P.409—412.
32. Lofdahl C.G., Chung K.F. Long-acting  $\beta_2$ -adrenoceptor agonists: a new perspective in the treatment of asthma // Eur. Respir. J.— 1991.— Vol.4.— P.218—226.
33. McCann J.D., Welsh M.J. Calcium-activated potassium channels in canine airway smooth muscle // J. Physiol. (Lond.).— 1986.— Vol.372.— P.113—127.
34. McManus O.B., Harris G.H., Giangiacomo K.M. et al. An activator of calcium-dependent potassium channels isolated from a medicinal herb // Biochemistry.— 1993.— Vol.32.— P.6128—6133.
35. Miura M., Belvisi M.G., Strelton C.D. et al. Role of potassium channel in bronchodilator responses in human airways // Am. Rev. Respir. Dis.— 1992.— Vol.146.— P.132—136.
36. Morthan R., Martin C., Amidce T., Mirroneau J. Calcium channel currents in isolated smooth muscle cells from human bronchus // J. Appl. Physiol.— 1989.— Vol.66.— P.1706—1714.
37. Murry L.F. Effects of a receptor operated channel blocker on intracellular calcium in human airway smooth muscle cells // Am. Rev. Respir. Dis.— 1992.— Vol.145.— P.A205.
38. Orlov S.N., Tremblay J., Hamet P. cAMP and cGMP influx and efflux in cultured vasculature smooth muscle cells (VSMC). // International Congress of Pharmacology, 12-th: Abstracts.— Montreal, 1994.— P.R1381.
39. Pike L.J. Phosphatidylinositol 4-kinases and the role of polyphosphoinositides in cellular regulation // Endocrinol. Rev.— 1992.— Vol.13.— P.692—706.
40. Quast U. Do the  $K^+$  channel openers relax smooth muscle by opening  $K^+$  channels? // Trends Pharmacol. Sci.— 1993.— Vol.14.— P.331—337.
41. Rembold C.M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle // Hypertension.— 1992.— Vol.20.— P.129—137.
42. Robison G.A., Sutherland E.W. Cyclic AMP and the function of eukaryotic cells: an introduction // Ann. N.Y. Acad. Sci.— 1971.— Vol.185.— P.5—9.
43. Small R.C., Foster R.W. Electrophysiology of the airway smooth muscle cell // Asthma: Basic Mechanisms and Clinical Management / Eds P.J.Barnes, I.W.Rodger, N.C.Thompson.— London: Academic Press, 1988.— P.35—56.
44. Torphy T.J., Udem R.J. Phosphodiesterase inhibitors — new opportunities for the treatment of asthma // Thorax.— 1991.— Vol.46.— P.488—503.
45. Ullman A., Hedner J., Svedmyr N. Inhaled salmeterol and salbutamol in asthmatic patients. An evaluation of asthma symptoms and the possible development of tachyphylaxis // Am. Rev. Respir. Dis.— 1990.— Vol.142.— P.571—575.
46. Waldeck B., Widmack E. Comparison of the effects of forskolin and isoprenaline on tracheal, cardiac and skeletal muscle from guinea-pig // Eur. J. Pharmacol.— 1985.— Vol.112.— P.349—359.

Поступила 04.07.94.