

*М.Б.Баскаков, Л.В.Капилевич, М.А.Медведев, И.В.Ковалев, Е.Ю.Петров,
Я.Д.Анфиногенова*

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ В ЭПИТЕЛИИ И ГЛАДКИХ МЫШЦАХ ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ

Сибирский государственный медицинский университет, НИИ курортологии и физиотерапии, Томск

INTRACELLULAR SIGNAL SYSTEMS IN EPITHELIUM AND SMOOTH MUSCLES OF RESPIRATORY TRACTS

M.B.Baskakov, L.V.Kapilevich, M.A.Medvedev, I.V.Kovaliov, E.Yu.Petrov, Ya.D.Anfinogenova

Summary

A role of intracellular signal systems for the regulation of the epithelium and smooth muscle relations in the respiratory tract as well as interaction of the secondary agents participating in regulation of the epithelium relaxing factor production with the consideration of its effect on the smooth muscles were studied. It has been determined that the relaxing factor production by the epithelium is a calcium dependent process which is regulated by the calmoduline type Ca^{2+} binding proteins and the C protein kinase. The mechanisms of ERF relaxing effect on smooth muscles depend on the interaction of two cyclic nucleotides (cAMP and cGMP) with the phosphodiesterase involvement.

Резюме

В работе изучалась роль внутриклеточных сигнальных систем в регуляции эпителиально-гладкомышечных взаимоотношений в респираторном тракте, взаимодействие вторичных посредников, участвующих в регуляции выработки эпителиального релаксирующего фактора (ЭРФ) и реализации его эффектов на гладкие мышцы. Установлено, что продукция релаксирующих факторов эпителием является кальцийзависимым процессом и регулируется при участии кальмодулинподобных Ca^{2+} -связывающих белков и протеинкиназы С. Механизмы релаксирующего эффекта ЭРФ на гладкие мышцы связаны со взаимодействием двух циклических нуклеотидов — цАМФ и цГМФ, осуществляющимся при участии фосфодиэстеразы.

Изучение механизмов регуляции электрических и сократительных свойств гладких мышц внутренних органов, выяснение патогенеза заболеваний и разработка способов коррекции функциональных расстройств являются актуальной проблемой современной физиологии и медицины. Особое значение названная проблема имеет для системы дыхания. Значительная часть заболеваний респираторной системы связана с нарушением регуляторных механизмов гладкомышечных клеток (ГМК) стенки воздухоносных путей [2,10].

Наряду с системной нейрогуморальной регуляцией дыхания, реализующейся посредством гормональных и медиаторных воздействий на ГМК, существенная роль отводится локальным механизмам поддержания гомеостаза. Локальные факторы — физиологически активные вещества, продуцируемые и действующие *in situ*, — играют важную роль в физиологических процессах и нередко в патологических реакциях. Важное место в локальной регуляции занимают эпителиально-гладкомышечные взаимодействия [3,13,16].

Внутренняя оболочка воздухоносных путей образована непрерывным слоем эпителия, расположенного на соединительнотканной базальной мембране. Это

высокоорганизованная, полифункциональная структура, подверженная многочисленным регуляторным воздействиям. На поверхности эпителиальных клеток представлены различные группы рецепторов; физиологически активные вещества способны модулировать потенциал и ионную проводимость мембраны эпителиоцитов. В реализацию их эффектов вовлекаются внутриклеточные сигнальные системы эпителия [7, 12,19].

Эпителий трахеи способен продуцировать расслабляющие и констрикторные факторы, существенно модулирующие сократительную активность гладких мышц. Однако в интактном состоянии интенсивность их продукции низкая. Поэтому после удаления эпителиального слоя амплитуда сократительных ответов сегментов трахеи на гиперкалиевый раствор Кребса и карбохолин не изменяется. Стимулятором продукции эпителиального релаксирующего фактора (ЭРФ) являются ионы кальция. Способностью модулировать релаксирующее влияние эпителиального слоя на ГМК обладают многие физиологически активные вещества (кальциевый ионофор А23187, гистамин, катехоламины) [2,3,4,13].

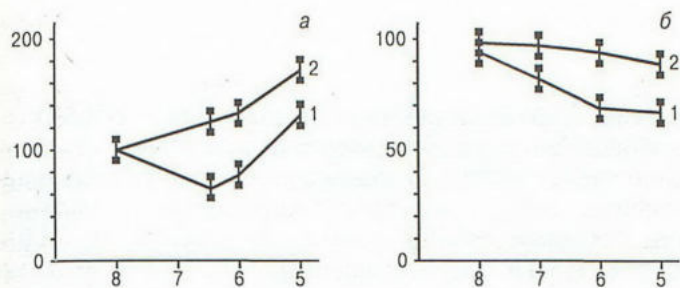


Рис. 1. Зависимость механического напряжения сегментов трахеи крыс от концентрации кальциевого ионофора А23187 (А) и фенилэфрина (Б).

1 — эпителий сохранен; 2 — эпителий удален. По оси ординат — механическое напряжение в% от амплитуды ответа на гиперкалиевый (30 мМ) раствор Кребса, по оси абсцисс — отрицательный логарифм концентрации.

В механизмах реализации дилататорных воздействий физиологически активных веществ важное место занимает эпителийзависимый путь. Адренергическое расслабление сегментов трахеи, предсокращенных карбохолином, в значительной степени угнетается после удаления эпителия [2,3]. Стимуляция катехоламинами продукции ЭРФ опосредуется преимущественно α -адренорецепторами мембраны респираторного эпителия [2].

В настоящей работе изучалась роль внутриклеточных сигнальных систем в регуляции эпителиально-гладкомышечных взаимоотношений, взаимодействие вторичных посредников, регулирующих выработку ЭРФ и его эффекты на гладкие мышцы.

Исследования проводились на белых крысах-самцах массой 250—300 грамм. Для изучения сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей приготавливали кольцевые сегменты трахеи шириной 3—4 мм. Эпителий удалялся механически, вращением деревянного шпателя в просвете в течение 1 мин. В установке каскадной перфузии использовали трубчатый препарат трахеи — донор — длиной 2 см с сохраненным эпителием. Сохранность или полнота удаления эпителия контролировалась гистологически, приготовленные срезы окрашивались гематоксилином и эозином.

Сократительная активность гладкомышечных сегментов регистрировалась с помощью механотрона 6МХ2Б в режиме, близком к изометрическому. Эффекты эпителия оценивались с помощью метода каскадной перфузии. В основу метода положена принципиальная схема "co-axial bioassay" [12]. Метод позволяет пространственно разделить продукцию ЭРФ и реализацию его эффекта. Физиологический раствор со скоростью 0,5 мл/мин перфузировался через просвет препаратов-доноров с сохраненным эпителием и затем поступал в камеру с деэпителизированными сегментами-акцепторами.

Использовался стандартный раствор Кребса следующего состава (мМ): NaCl — 120,4; KCl — 5,9; NaH₂PO₄ — 1,2; MgCl₂ — 1,2; CaCl₂ — 2,5; NaHCO₃ — 15,5; глюкоза — 11,5; pH 7,3—7,35, температура — 36,5—37°C. Раствор аэрировался карбогеном. Используемые препараты: трифторперазин, хлорпрома-

зин, имипрамин (Минздравмедпром, РФ); метиленовый синий (Реахим, РФ); А23187, тетраэтиламмоний, Н-9, стауроспорин, теofilлин, GTP- γ -S ("Sigma", США); нитропруссид натрия ("Serva", ФРГ). Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики.

Добавление в перфузионный раствор 0,5 мкМ кальциевого ионофора А23187 либо 1 мкМ агониста альфа-адренорецепторов фенилэфрина (в присутствии 1 мкМ пропранолола) вызывало дозозависимое расслабление сегментов трахеи крыс с сохраненным эпителием. После механического удаления эпителия эти эффекты полностью угнетались (рис.1).

Ионы кальция реализуют свое действие посредством кальциевой сигнальной системы, состоящей из двух ветвей — кальцийзависимой и С-киназной [18]. Для изучения первой из них используют ингибиторы кальмодулинзависимых процессов. Поскольку большинство антагонистов кальмодулина, в частности фенотиазины, характеризуются низкой специфичностью, мы использовали методический прием, основанный на определении ЕС₅₀ для ингибиторов кальмодулинзависимых процессов и сравнении их с константами диссоциации комплекса антагонистов с кальмодулином [1].

Предобработка препаратов-доноров ЭРФ трифторперазином (10 мкМ, 20 мин) в значительной степени угнетала расслабление сегментов-акцепторов по сравнению с контролем (рис.2, Б). В наших экспериментах определялась зависимость величины эпителийопосредованного расслабления от концентрации фенотиазинов — трифторперазина, хлорпромазина и имипрамина. После предобработки препаратов-доноров названными соединениями дозозависимо угнеталась амплитуда опосредованных эпителием реакций на воздействие ионофора А23187 и фенилэфрина.

В таблице приведены значения ЕС₅₀ для использованных антагонистов кальмодулина и величины констант диссоциации их комплекса с кальмодулином, определенные [8] методом вытеснения dis-C₃-5. Вели-

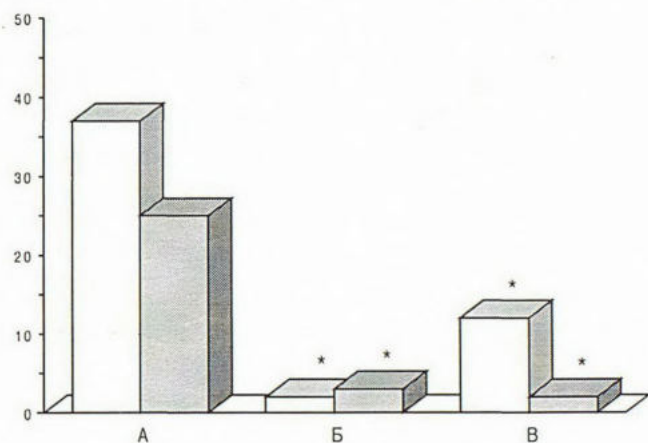


Рис.2. Амплитуда эпителийзависимого расслабления сегментов трахеи крыс в экспериментах с каскадной перфузией, индуцированное воздействием 0,5 мкМ А23187 (светлые столбики) и 1 мкМ фенилэфрина (темные столбики).

А — интактные препараты — доноры; Б — после предобработки трифторперазином (10 мкМ); В — стауроспорином (10 нМ); * — достоверность отличия от контроля, $p < 0,05$.

Т а б л и ц а

Характеристики антагонистов кальмодулина ($M \pm m$)

Фенотиазины	$K_{0,5}$ вытеснения $dis-C_3-5$ из комплекса с КМ [8]	EC_{50} для угнетения ЭП-зависимых реакций ГМК
Трифторперазин	4,0 мкМ	$3,2 \pm 0,2$ мкМ $n=7$
Хлорпромазин	17,0 мкМ	$28,5 \pm 1,3$ мкМ $n=6$
Имипрамин	0,15 мМ	$0,35 \pm 0,07$ мМ $n=6$

Примечание. n — количество экспериментов. $p < 0,05$.

чины EC_{50} регистрации расслабления составляли ряд, совпадающий с рядом родства их к кальмодулину: трифторперазин < хлорпромазин < имипрамин. Полученные данные свидетельствуют об участии кальмодулинподобных Ca^{2+} -связывающих белков в регуляции продукции релаксирующего фактора респираторным эпителием трахеи крыс.

Вторая ветвь кальцийзависимой сигнальной системы связана с протеинкиназой С (ПК-С), ответственной за поддерживаемый ответ. Большинство исследований роли ПК-С выполняли с использованием ее активаторов — форболовых эфиров [1]. Сравнительно недавно для этой цели стал применяться антибиотик стауроспорин, селективно ингибирующий активность названного фермента.

В экспериментах с каскадной перфузией было установлено, что после 20-минутной предобработки препарата-донора стауроспорином (10 нМ) расслабление сегментов-акцепторов как при воздействии ионофора, так и фенилэфрина существенно угнеталось (рис. 2, В). Это дает основания полагать, что протеинкиназа С вносит значительный вклад в регуляцию продукции релаксирующего фактора респираторным эпителием.

Во второй части работы исследовалась роль внутриклеточных сигнальных систем ГМК в регуляции эпителийзависимого расслабления. Сегменты трахеи — акцепторы предобрабатывали метиленовым синим (50 мкМ), продукция донором релаксирующего фактора стимулировалась Ca^{2+} -ионофором А23187 (0,5 мкМ). Для сравнения оценивалось влияние 1 мкМ нитропруссид натрия на механическое напряжение сегментов трахеи. Препараты-акцепторы предсокращались гиперкалиевым раствором Кребса (30 мМ КСl). Как видно из результатов, представленных на рис. 3, Б, предобработка гладкомышечных сегментов метиленовым синим полностью подавляла эпителийзависимое расслабление, стимулируемое А23187. Релаксирующее влияние нитропруссид натрия достоверно уменьшалось ($p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют, что гуанилатциклаза (ГЦ) участвует в эпителийзависимом расслаблении ГМК трахеи крыс. Очевидно, физиологические механизмы, лежащие в основе эпителиально-гладкомышечного взаимодействия

в воздухоносных путях и кровеносных сосудах, имеют значительное сходство.

В следующей серии экспериментов исследовали участие цАМФ-зависимых протеинкиназ (ПК-А) в регуляции эпителийзависимого расслабления гладких мышц трахеи крысы. В опытах с каскадной перфузией сегменты-«акцепторы» предобрабатывались соединением $N-(2\text{-аминоэтил})\text{-5-изоквинолинсульфонамид}$ (Н-9). Предобработка гладкомышечных сегментов Н-9 (2 мкМ) полностью подавляла эпителийзависимое расслабление, индуцируемое А23187. Эффект нитропруссид натрия (1 мкМ) снижался в значительной степени (рис. 3, В). Полученные результаты дают основания для предположений об участии цАМФ-зависимых протеинкиназ в эпителийопосредованном и нитропруссидиндуцированном расслаблении ГМК респираторного тракта.

В пользу этого утверждения косвенно свидетельствуют также наши данные об увеличении калиевой проводимости сарколеммы при эпителийзависимом расслаблении ГМК и при действии нитропруссид натрия. В данной серии экспериментов дезэпителизированные сегменты трахеи крыс предсокращали гиперкалиевым (30 мМ) раствором Кребса либо тетраэтиламмонием (ТЭА, 10 мМ). Полученные результаты представлены на рис. 3, Г. Индукция выработки ЭРФ эпителием донора аппликацией ионофора снижала механическое напряжение сегментов трахеи, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса. Блокатор калиевых каналов тетраэтиламмоний полностью подавлял эпителийзависимое расслабление и существенно угнетал реакцию на добавление нитропруссид натрия.

Из полученных результатов можно заключить, что эпителийзависимое расслабление ГМК трахеи крыс, как и их реакция на нитросоединения, связаны с

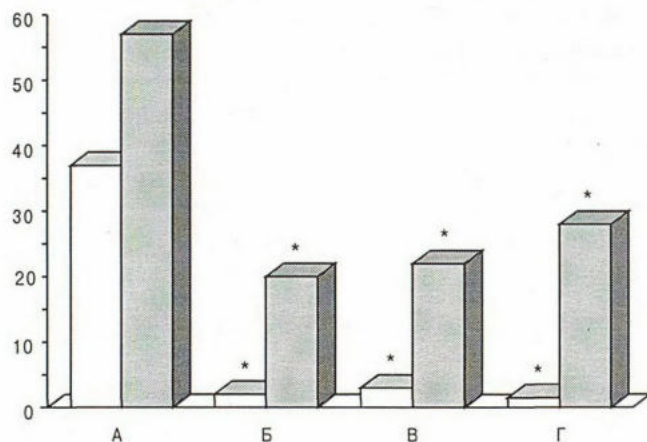


Рис. 3. Амплитуда эпителийзависимого расслабления сегментов трахеи крыс в экспериментах с каскадной перфузией, индуцированное воздействием 0,5 мкМ А23187 (светлые столбики) и влияние 1 мкМ нитропруссид натрия на механическое напряжение дезэпителизированных сегментов (темные столбики).

А — интактные сегменты; Б — после предобработки метиленовым синим (50 мкМ); В — Н-9 (2 мкМ); Г — тетраэтиламмонием (10 мМ). * — достоверность отличия от контроля $p < 0,05$.

активацией калиевой проводимости мембраны. Открывание калиевых каналов является одним из важных механизмов реализации внутриклеточных эффектов цАМФ-зависимых протеинкиназ в ГМК [1]. В то же время в литературе нет данных о влиянии цГМФ на калиевую проводимость мембраны ГМК. Полученные результаты являются еще одним важным аргументом в пользу гипотезы об участии цАМФ-зависимых протеинкиназ в эпителийзависимом расслаблении гладких мышц респираторного тракта и их реакциях на нитросоединения.

Заключение

Большинство исследователей склонны связывать эпителийзависимое расслабление ГМК с активацией ГЦ и цГМФ-зависимых протеинкиназ (ПК-G), стимулирующих кальциевые насосы сарколеммы и ретикулума как в кровеносных сосудах [6,15], так и респираторных путях [7,11]. Имеются сообщения о способности ингибиторов NO-синтазы подавлять расслабление ГМК бронхов человека и о зависимости механического напряжения ГМК респираторного тракта от содержания цГМФ [14].

Полученные нами данные позволяют утверждать, что в ГМК трахеи крысы релаксирующий эффект активации ГЦ реализуется с участием цАМФ-зависимой сигнальной системы. В доступной литературе этот вопрос не затрагивался. Однако имеются сообщения, косвенно свидетельствующие, что в ГМК кровеносных сосудов при активации ГЦ модулируются цАМФ-зависимые процессы. Это и сходство в кинетике цикла расслабления — сокращения, и активация калиевой проводимости мембраны, и развитие гиперполяризации [15].

Изложенные данные свидетельствуют, что наряду с ГЦ в расслаблении ГМК, индуцируемом ЭРФ и нитросоединениями, непосредственное участие принимают цАМФ-зависимые протеинкиназы. Наиболее вероятной точкой взаимодействия цАМФ и цГМФ-зависимых процессов является фосфодиэстераза циклических нуклеотидов (ФДЭ). Это цитоплазматический фермент, активируемый кальмодулином и способный осуществлять гидролиз обоих циклических нуклеотидов [11]. Причем сродство нативной ФДЭ к цГМФ превышает сродство к цАМФ более чем на порядок. В работе [17] приводятся значения констант сродства очищенной ФДЭ, полученной из ГМК трахеи собаки, — 0,14 мкМ к цГМФ и 6 мкМ к цАМФ. В intactных клетках основным субстратом ФДЭ является цАМФ, так как его содержание в цитозоле намного выше, концентрация цГМФ не превышает нескольких наномолей.

Анализ собственных данных и соотнесение их с приведенными сообщениями позволили выдвинуть гипотезу об участии цАМФ-зависимых протеинкиназ в механизмах эпителийзависимого расслабления (рис.4). Вероятно, что активация ГЦ приводит к возрастанию концентрации цГМФ в цитозоле. Благодаря более высокому сродству к ФДЭ цГМФ конкурентно ингибирует гидролиз цАМФ.

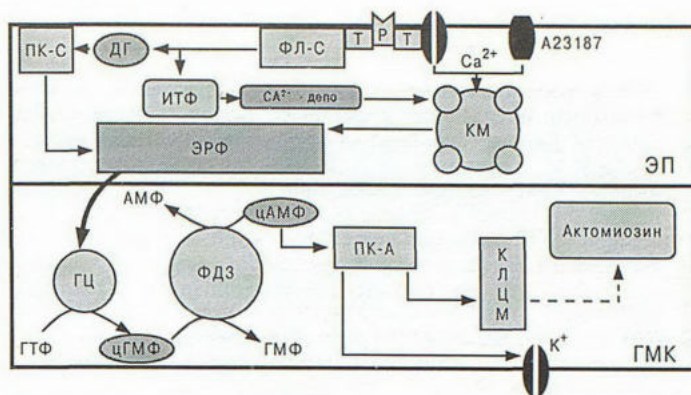


Рис.4. Взаимодействие внутриклеточных сигнальных систем, вовлекаемых в эпителийзависимую регуляцию сократительной активности гладких мышц.

АМФ (ГМФ) — аденозин(гуанозин)монофосфат; цАМФ (цГМФ) — циклический АМФ (ГМФ); ГТФ — гуанозинтрифосфат; ГЦ — гуанилатциклаза; ДГ — диацилглицерин; ИТФ — инозитолтрифосфат; КЛЦМ — киназа легких цепей миозина; КМ — кальмодулин; ПК-А — протеинкиназа А; ПК-С — протеинкиназа С; Р — рецептор; Т — трансдуктор; ФДЭ — фосфодиэстераза; ФЛ-С — фосфолипаза С; ЭП — эпителий; ЭРФ — эпителиальный релаксирующий фактор.

Таким образом, регуляция эпителиально-гладкомышечных взаимоотношений в респираторном тракте осуществляется путем взаимодействия нескольких сигнальных систем. Продукция релаксирующих факторов эпителием является кальцийзависимым процессом и регулируется при участии кальмодулинподобных Ca^{2+} -связывающих белков и протеинкиназы С. Механизмы релаксирующего эффекта ЭРФ на гладкие мышцы связаны со взаимодействием двух циклических нуклеотидов — цАМФ и цГМФ, осуществляющимся при участии ФДЭ. Одним из ключевых звеньев регуляторной цепи является калиевая проводимость мембраны ГМК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баскаков М.Б., Медведев М.А. Исследование механизмов регуляции вторичными посредниками электрической и сократительной активности гладких мышц желудочно-кишечного тракта // Экспериментальная и прикладная физиология. Физиология висцеральных систем. — СПб., 1992. — Т.3.
2. Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А. и др. Эпителиально-гладкомышечное взаимодействие в регуляции тонуса воздухоносных путей // Физиол. журн. имени И.М.Сеченова. — 1995. — Т.81, № 7. — С.99—105.
3. Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А. и др. Зависимая от эпителия регуляция сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей // Бюл. exper. биол. — 1995. — № 3. — С.283—285.
4. Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А. и др. Механизмы, обеспечивающие резистентность гладких мышц трахеи крысы к гистамину // Там же. — № 9. — С.283—285.
5. Костюк П.Г. Кальций и клеточная возбудимость. — М.: Наука, 1986.
6. Медведева Н.А., Медведев О.С. Фармакология эндотелийзависимых сосудистых реакций // Фармакол. и токсикол. — 1988. — № 5. — С.92—101.
7. Реутов В.П., Орлов С.Н. Физиологическое значение гуанилатциклазы и роль окиси азота и нитросоединений в регуляции активности этого фермента // Физиология человека. — 1993. — Т.19, № 1. — С.124—137.
8. Феоктистов И.А. Влияние ингибиторов кальмодулина на тропонин С, киназу фосфориллазы, фосфодиэстеразу циклических

- нуклеотидов и АТФазу актомиозина: Автореф. дис. ... канд мед. наук.— Томск, 1985.
9. Хавинсон В.Х., Кожемякин А.Л. Релаксирующее действие олигопептидов, выделенных из слизистой трахеи и легочной паренхимы на гладкую мускулатуру изолированной трахеи крыс // Бюл. exper. биол.— 1992.— № 5.— С.483—486.
 10. Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г. Физиология сосудистых гладких мышц.— Киев: Наукова думка, 1988.
 11. Barnes P.J. Cyclic nucleotides and phosphodiesterases and airway function // Eur. Respir. J.— 1995.— Vol.8.— P.457—462.
 12. Fernandes L.B., Paterson J.M., Goldie R.G. Co-axial bioassay of a smooth muscle relaxing factor released from guinea-pig tracheal epithelium // Br.J.Pharmacol.— 1989.— Vol.96.— P.117—124.
 13. Gao J., Vanhoutt P.M. Respiratory epithelium modulators the responses of canine bronchi to cooling // J. Appl.Physiol.— 1993.— Vol.74, № 5.— P.2421—2425.
 14. Katzuki S., Murad F. Regulation of cyclic aMP and cyclic GMP levels and contractility in bovine tracheal // Mol. Pharmacol.— 1977.— Vol.13.— P.330—341.
 15. Lum H., Asrar B.M. Regulation of vascular endothelial buffer function // Am. J. Physiol.— 1994.— Vol.276, № 3.— P.L223—L241.
 16. Panitch H.B., Wolfson M.R., Shaffer T.H. Epithelial modulation of preterm airway smooth muscle contraction // J. Appl. Physiol.— 1993. Vol.74, № 3.— P.1437—1443.
 17. Polson J.B., Krzanowski J.J., Szentivanyi A. Inhibition of a high affinity cyclic AMP phosphodiesterase and relaxation of canine tracheal smooth muscle // Biochem.Pharmacol.— 1982.— Vol.31, № 21.— P.3403—3406.
 18. Rasmussen H., Takuwa Y., Park S. PK C in the regulation of smooth muscle contraction // FASEB J.— 1987.— Vol.1—3.— P.177—185.
 19. Xie Z., Hakoda H., Ito I. Airway epithelial cells regulate membrane potential, neurotransmission and muscle tone of dog airway smooth muscle // J.Physiol.— 1992.— Vol.449.— P.619—639.

Поступила 23.06.96.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1997

УДК 616.248—085.234

*А.С.Соколов, С.Я.Скачилова, Е.В.Бабарсков, В.А.Кеменова, В.М.Павлов,
В.С.Ермаков*

ПОДХОДЫ К СОВРЕМЕННОЙ ФАРМАКОТЕРАПИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ В РОССИИ

НИИ пульмонологии МЗ РФ, Москва

APPROACHES TO THE CONTEMPORARY PHARMACOTHERAPY OF THE BRONCHIAL ASTHMA IN RUSSIA

A.S.Sokolov, S.Ya.Skachilova, E.V.Babarskov, V.A.Kemenova, V.M.Pavlov, V.S.Ermakov

Summary

The article presents the data about the place and the role of a new antiasthmatic drug generation produced in Russia for the bronchial asthma pharmacotherapy. Technological and pharmacological features of the drugs as well as their principle and therapy efficiency are described. This data given grounds a possibility of a reliable controlling the bronchial asthma with Russian medicines.

Резюме

В статье приводятся данные о месте и роли новой генерации отечественных проваоастматических средств в современной фармакотерапии бронхиальной астмы. Описываются технологические и фармакологические особенности лекарственных форм, принцип действия и их клиническая эффективность. Приведенные сведения дают основания говорить о возможности надежного контроля за течением бронхиальной астмы с помощью отечественных лекарственных препаратов.

Представление о том, что в основе бронхиальной астмы лежит хроническое воспаление дыхательных путей, является краеугольным камнем ее современной фармакотерапии [1]. Такой подход в значительной мере позволил оптимизировать лечение больных, достаточно четко определить круг лекарственных средств и основные тенденции развития фарминдустрии в этой области. В настоящее время на различных этапах болезни клиницисты используют в основном комбинации препаратов нескольких фармакологических групп.

Приоритет сохраняется за глюкокортикостероидами, "мембраностабилизаторами", бета-2-агонистами адренергических рецепторов, метилксантинами, блокаторами H₁-гистаминовых рецепторов.

До начала 90-х годов в нашей стране производство современных лекарственных форм (основными достоинствами которых являются высокая специфическая активность, безопасность, удобства в использовании, экологичность) этой важнейшей группы препаратов практически отсутствовало, и страна систематически