

УДК 546.17:577.152.16:616.2'085.217.34

Е.В. Елисеева

ЦЕНТРАЛЬНЫЕ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ В РЕАЛИЗАЦИИ ЭФФЕКТОВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Городская клиническая больница № 2 (г. Владивосток), Владивостокский государственный медицинский университет

Ключевые слова: оксид азота, нитрооксидсинтаза, фармакотерапия.

Еще совсем недавно трудно было даже представить, что простейшее химическое соединение – оксид азота (NO) – вызовет поистине революционное изменение наших взглядов и заставит коренным образом пересмотреть многие ключевые положения в области клеточной биологии и биохимии, патологии физиологии и фармакологии. Благодаря широчайшему спектру функций, регулируемых NO, – от передачи нервных импульсов до реализации цитотоксических эффектов – интерес к этой уникальной сигнальной молекуле не ослабевает, несмотря на довольно внушительную по современным меркам историю изучения.

Первоначально (конец 80'х – начало 90'х годов XX века) исследовательская активность была сконцентрирована преимущественно на роли NO в регуляции висцеральных функций. В настоящее время перечень реакций, протекающих с участием оксида азота, настолько внушителен, что, пожалуй, не осталось ни одного физиологического или патологического процесса, абсолютная необходимость присутствия NO для которого не была бы установлена. Новая волна интереса к оксиду азота связана с появлением клинических и экспериментальных данных об его участии в действии лекарственных веществ. Первоначально подобную возможность связывали с наличием у NO свойств, присущих «классическим» внутриклеточным мессенджерам, а именно: высокая скорость синтеза, быстрое превращение в неактивные соединения после прекращения поступления внешнего сигнала, эффективность в низких (пикомолярных) концентрациях. Полагали, что значение NO в реализации эффектов фармакологических препаратов можно рассматривать наряду с такими соединениями, как цАМФ, цГМФ, Ca²⁺, IP₃ [4]. В дальнейшем было показано, что NO не только модулирует внутриклеточную концентрацию ионов кальция за счет активации растворимой гуанилатциклазы с последующим образованием цГМФ: на модели многоуровневого анализа регуляции респираторной функции нам удалось экспериментально доказать, что конечный эффект ряда препаратов, в частности адрено- и холинэргического действия, зависит от изоформы

NO-синтазы (NOS) – фермента, катализирующего образование NO.

Сложность подобного исследования состояла в необходимости исключения факторов, которые могут оказать прямое или опосредованное воздействие на активность изучаемого фермента. Для объективизации результатов мы проводили изучение активности различных изоформ нитрооксидсинтазы на целом организме (ингаляционное введение препаратов), на органной культуре (медиастинальная плевра) и культуре клеток. Существующие современные методы – гистохимические, иммуногистохимические, цитологические, биохимические – были собраны в единую, методически стройную систему исследования. Таким образом, при многоуровневом моделировании регуляции респираторной функции было экспериментально подтверждено, что оксид азота является ключевым звеном в реализации фармакологических эффектов целого ряда лекарственных препаратов.

Морфологическим субстратом синтеза NO в органах дыхания являются нейроны иерархической нитрооксидергической системы, включающей ретикулярную формацию продолговатого мозга, двойное ядро, ядро одиночного пути, заднее ядро, узловатый ганглий, интрамуральные вегетативные ганглии трахеи и бронхов, экспрессирующие нейрональную NOS (nNOS) – фермент, регулируемый генами 12 хромосомы [1]. Конститутивную nNOS содержат эпителиоциты кондукторных и респираторных отделов. Соудистый эндотелий и тучные клетки экспрессируют эндотелиальную NOS (eNOS), фермент регулируется генами 7 хромосомы. Индуцибельная NOS – iNOS – имеется в олигодендроцитах, родственных им сателлитах и легочных макрофагах, энзим экспрессируется генами 17'й хромосомы. Уровень синтеза iNOS mRNA в эпителиоцитах возрастает в условиях измененной пространственной информации или у предрасположенных субъектов [7, 8]. Экспрессия iNOS в эпителиоцитах и макрофагах может провоцироваться даже при вмешательствах, не имеющих непосредственного отношения к бронхолегочной системе. Как, например, показана активация iNOS топических альвеолярных макрофагов в послеоперационном периоде при эзофагэктомии [10].

Для совокупности нейронов, обслуживающих органы дыхания, реализация эффектов адрено- и холинэргических препаратов осуществляется через конститутивную nNOS, поскольку даже в условиях аллергического воспаления и при вагусной деафферентации в данных клетках не происходит инверсии экспрессии nNOS в iNOS. В норме результатом действия ацетилхолина являются рост доли nNOS-позитивных клеток в протонейронах узловатого ганглия до 90% и увеличение активности nNOS более чем в шесть раз [3]. В дорсальном ядре число клеток, положительно реагирующих на nNOS, возрастает вдвое. Таким образом, результаты экспериментальных проб свидетельствуют о том, что регуляция образования

оксида азота нейронами дорсального ядра и узлова того ганглия блуждающего нерва осуществляется через холинорецепторы. В пользу данного утверждения говорит тот факт, что динамика активности фермента нейроцитов нивелируется введением неселективного блокатора мускариновых рецепторов атропина, что свидетельствует о взаимосвязи между стимуляцией холинорецепторов и экспрессией nNOS в системе n. vagus [3]. О доминировании функционального взаимодействия между NO'ергическим и холинергическим механизмами в условиях физиологической нормы свидетельствует отсутствие влияния ингаляционных бета'агонистов на состояние nNOS у здоровых животных. Напротив, при экспериментальной бронхиальной астме наиболее показательные изменения активности nNOS в протонейронах узлового ганглия происходят при ингаляционном введении адrenoагонистов: бета'агонист короткого действия фенотерол и пролонгированный бета'агонист сальметерол блокируют экспрессию нейрональной NOS [2].

В отличие от системы нитрооксидергических нейронов, где экспрессируется исключительно нейрональная NOS, бронхи представляют собой гетерогенную систему, где в поддержании функционального равновесия участвуют несколько изоэнзимов NOS. Эктодермальные производные содержат нейрональную изоформу этого фермента, мезенхимальные — эндотелиальную или индуцибельную [1]. Поэтому конечный эффект — дилатация или констрикция гладких миоцитов — определяется не активностью NO'синтазы, а иммуногистохимическими характеристиками фермента. Действие холинореактивных веществ реализуется исключительно через конститутивную, нейрональную синтазу, в то время как эффекты препаратов адренергического действия модулируются различными изоформами NOS — как конститутивной, так и индуцибельной.

В физиологических условиях релаксация гладких миоцитов бронхов напрямую связана с активностью nNOS в эпителии. В свою очередь повреждение целостности эпителиального пласта приводит к повышению чувствительности бронхов к констрикторным стимулам и ослабляет их реакцию на адреномиметики. Ацетилхолин — медиатор аксонов блуждающего нерва и агонист NOS — активирует нейрональную NOS эпителиоцитов стимулирует синтез NO и, в конечном итоге, релаксирует бронхи. В условиях физиологической нормы на введение бета'агонистов бронхи здоровых животных отвечают реакцией, сходной с реакцией на ацетилхолин. Напротив, бета'блокаторы стимулируют NO'синтазную активность эпителиоцитов респираторного и кондукторного отделов за счет экспрессии индуцибельной изоформы фермента. В отличие от здоровых, у животных с экспериментальной бронхиальной астмой состояние мышечного аппарата бронхов определяется экспрессией iNOS, на которую, согласно нашим данным, холиномиметики влияния не оказывают. Действие ацетилхолина

через кальцийзависимую NOS подтверждается отсутствием изменения базальной секреции iNOS легочными макрофагами. В условиях экспериментальной модели бронхиальной обструкции β

2'агонисты фенотерол и сальметерол блокируют экспрессию iNOS в эпителиоцитах и угнетают ее активность в альвеолярных макрофагах. Данный эффект является дозозависимым и в большей степени выражен у пролонгированного бета'агониста сальметерола. Бета'блокатор пропранолол при экспериментальной бронхиальной астме индуцирует экспрессию iNOS в эпителиоцитах, альвеоцитах I и II типов и усиливает ее активность в легочных макрофагах. В основе данных феноменов, по-видимому, лежит опосредованное β 2'адренорецепторами ингибирование экспрессии мРНК iNOS [5].

Экспериментальные данные свидетельствуют, что пролонгированные бета'агонисты обладают противовоспалительным эффектом, который обусловлен их ингибирующим действием на экспрессию iNOS эпителиоцитов и легочных макрофагов [1, 3]. Для уточнения механизма действия данных препаратов нами проведены дополнительные исследования на культуре клеток мышечной неоплазмы P 388 D1, экспрессирующей iNOS. Уже через несколько часов после инкубации наблюдалось дозозависимое снижение содержания нитрит-иона в супернатанте, свидетельствующее об уменьшении активности iNOS. Даже спустя 72 часа уровень нитрит-иона для клеток, обработанных сальметеролом, сохранялся ниже контрольных значений. Ингибирующее действие бета'агонистов на iNOS в большей степени было выражено в отношении клеток, где активность фермента была дополнительно стимулирована липополисахаридом. При использовании фенотерола эффект депрессии синтеза NO сохранялся двое суток, а для клеток, обработанных сальметеролом, показатели метаболитов NO оставались ниже контрольных значений в течение 72 часов [1].

В работах зарубежных авторов последних лет появились сообщения о том, что сходным действием в отношении iNOS обладает бета'агонист тербуталин [11]. В эксперименте на животных с моделью септического шока было продемонстрировано не только супрессивное действие тербуталина в отношении iNOS, но и уменьшение синтеза фактора некроза опухоли и супероксид-аниона.

Однако даже выполненный на высоком методическом уровне эксперимент без последующего или параллельного клинического изучения не дает возможности экстраполировать полученные данные на человека. Эта оговорка применима и для данных, полученных на клеточной культуре, поскольку реакция NOS в условиях организма может отличаться от ответа на фармакологический препарат в культуральных условиях. Только сопоставив экспериментальные данные и данные функциональных и лабораторно-клинических исследований, можно обсуждать причинно-следственную взаимосвязь между активностью NO

и реализацией фармакологических эффектов изученных лекарственных веществ в прикладном аспекте. Подтверждающие экспериментальные клинические данные получены нами путем косвенной оценки нитрооксидной продуцирующей функции дыхательных путей у больных со стабильным течением бронхиальной астмы при исследовании уровня метаболитов NO в конденсате выдыхаемого воздуха.

Результаты клинических исследований нитрооксидной продуцирующей функции дыхательных путей больных бронхиальной астмой находятся в соответствии с результатами, полученными в эксперименте на животных и в опытах на клеточной культуре. Фармакологический тест с фенотеролом у больных со стабильным течением тяжелой бронхиальной астмы показал снижение экспирации NO. Таким образом, цитохимические и иммуногистохимические данные, полученные на модели бронхиальной астмы, могут использоваться как для изучения патогенетических механизмов бронхиальной астмы, так и для оценки действия фармакологических препаратов [1].

Антагонисты мускариновых рецепторов как бронходилататоры при бронхиальной астме менее эффективны, чем бета-агонисты. Однако при совместном применении антихолинергических препаратов и бета-агонистов наблюдается аддитивный эффект. Усиление бронхолитического ответа при комбинированном назначении бета-агонистов и антихолинергических препаратов обусловлено не только различным уровнем воздействия (соответственно дистальные и проксимальные бронхи), но и одновременным воздействием на различные изоэнзимы NOS. Эффект антагонистов мускариновых рецепторов в большей степени выражен в отношении крупных бронхов [6], в эпителиоцитах которых экспрессируется преимущественно конститутивный фермент, в то время как бронходилатирующий эффект бета-агонистов связан с угнетением экспрессии iNOS эпителия мелких бронхов.

Разумеется, группа лекарственных средств, оказывающих прямое или опосредованное действие на активность NOS, не ограничивается адrenomиметическими или холинореактивными препаратами. Перечень лекарственных веществ, оказывающих прямое или косвенное воздействие на состояние NOS и образование оксида азота, непрерывно расширяется. Так, помимо глюкокортикоидов, индометацина, этанола, блокирующее действие которых было известно ранее, список препаратов, ингибирующих экспрессию iNOS, в настоящее время дополнили кетамин, морфин и др. [9]. Помимо ацетилхолина или нитратов, модулирующее действие в отношении эндотелиального релаксирующего фактора продемонстрировано для бета-блокаторов (небиволол), перфторуглеродов (перфторан), аспирина, озагреля и т.д. [13]. В то же время появляется множество новых вопросов, связанных с возможностью фармаколо-

гической коррекции синтеза NO. Так, в дальнейшем изучении нуждается влияние на синтез iNOS комбинированного использования лекарственных средств. Известно, например, что сочетанное назначение амоксициллина и глюкокортикоидов усиливает ингибирующий эффект последних в отношении iNOS [12].

Таким образом, оксид азота не только выполняет интегративную функцию, но и участвует в реализации фармакологического эффекта лекарственных веществ. Благодаря внедрению современных методов исследования отечественные и зарубежные ученые постоянно получают возможность открывать все новые и новые грани одного из наиболее ярких фундаментальных научных направлений в биологии и медицине – изучении биологической роли оксида азота.

Литература

1. Елисеева Е.В. *Нитрооксидергическая регуляция легких*. – Владивосток, 2001.
2. Елисеева Е.В. // *Цитология*. – 2002. – № 2. – С. 188–194.
3. Елисеева Е.В., Романова Н.Е., Баранов В.Ф., Мотавкин П.А. // *Морфология*. – 2002. – № 2. – С. 32–36.
4. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. *Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих*. – М: Наука, 1997.
5. Boomershine et al. // *J. Neuroimmunol.* – 1999. – Vol. 101, No. 1. – P. 68–75.
6. Campbell S.C. // *Respir. Care*. – 2000. – P. 864–867.
7. Giner Munoz M. // *Allergol. Immunopathol.* – 2000 – Vol. 28, No. 3. – 124–135.
8. Guo F.H., Comhair S.A., Zheng S. et al. // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164, No. 11. – P. 5970–5980.
9. Helmer K.S., Cui Y., Dewan A., Mercer D.W. // *J. Surg. Res.* – 2003. – Vol. 112, No. 1. – P. 70–78.
10. Kooguchi K., Kobayashi A., Kitamura Y. et al. // *Crit. Care Med.* – 2002. – Vol. 30, No. 1. – P. 71–76.
11. Liaw W.J., Tzao C., Wu J.Y. et al. // *Shock*. – 2003. – Vol. 19, No. 3. – 281–288.
12. Parra A., Garcia Olmos M., Nieto E. et al. // *Infection*. – 2002 – Vol. 30, No. 3. – P. 150–156.
13. Tarumi T., Shirahase H., Kanda M. et al. // *Life Sci.* – 2003. – Vol. 72, No. 16. – 1841–1850.

Поступила в редакцию 02.10.03.

CENTRAL AND PERIPHERAL NITROXYDERGICAL MECHANISMS IN COURSE OF REALIZATION OF EFFECTS OF PHARMACOLOGICAL PREPARATIONS

E.V. Eliseeva

Municipal Clinical Hospital No. 2 (Vladivostok), Vladivostok State Medical University

Summary – In this article the author brings up for discussion the findings of original experimental and clinical investigations that witness to nitric oxide participation in course of realization of effects of pharmacological preparations. By using of the model of multilevel regulation of respiratory function, the physician demonstrates the participation of central and peripheral nitroxidergical mechanisms of action of adrenergic and cholinergic active medications by means of different isoforms of nitroxyde synthase.

Pacific Medical Journal, 2003, No. 3, p. 18–20.