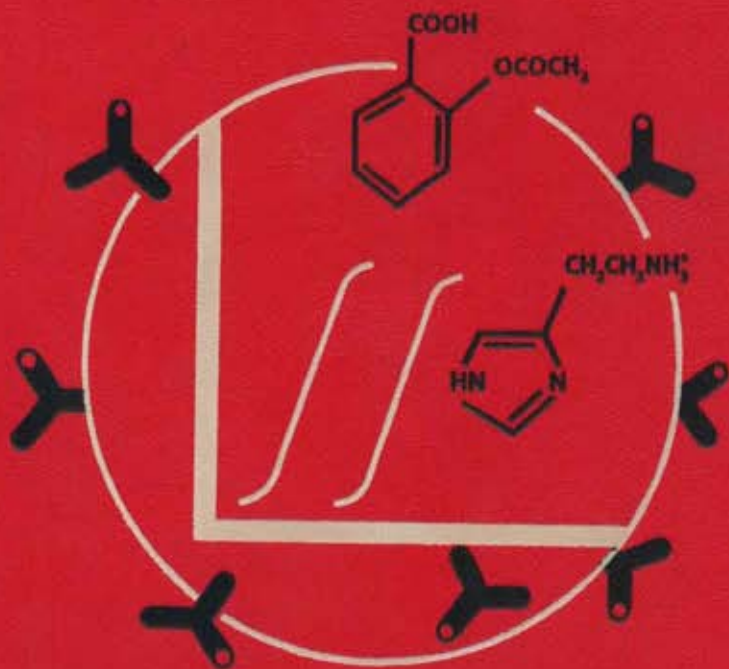


Руководство по иммунофармакологии

ПОД РЕДАКЦИЕЙ
М.М.ДЕЙЛА
ДЖ.К.ФОРМЕНА



под редакцией
М.М.ДЕЙЛА,
ДЖ.К.ФОРМЕНА

Руководство по иммунофармакологии

ПЕРЕВОД С АНГЛИЙСКОГО КАНД. МЕД. НАУК О.Г. ЯНОВСКОГО
ПОД РЕДАКЦИЕЙ Д-РА МЕД. НАУК Б.СУТЕШЕВА



МОСКВА "МЕДИЦИНА" 1998

УДК 615.276.2.4.015.46(035)
ББК 52.5 Р84

Издание рекомендовано для перевода проф. **Б. С. УТЕШЕВЫМ**,
зав. кафедрой фармакологии Российского государственного ме-
дицинского университета

Руководство по иммунофармакологии: Пер. с англ./Под ред. Р84
М.М. Дейла, Дж. К. Формена.-М.: Медицина, 1998, 332 с: ил.
ISBN 5-225-00567-5
ISBN 0-632-01948-4

В руководстве изложены основные проблемы и достижения иммуно-
фармакологии. Рассмотрены отдельные группы иммунотропных препа-
ратов, описаны функции некоторых клеточных популяций, механизмы
основных иммунологических реакций и регуляторные молекулы, осущест-
вляющие межклеточное взаимодействие.

Для иммунофармакологов, иммунологов и клиницистов, занимающихся
вопросами иммунокоррекции.

ББК 52.5

Руководство по иммунофармакологии

Зав. редакцией **О. Ю. Шешукова**. Редактор издательства **И. Ф. Иванченко**. Ре-
дактор **Т. С. Елистратова**. Художественный редактор **С. М. Лымина**. Переплет
художника **А. Е. Григорьева**. Технический редактор **Н. М. Гаранкина**. Корректор
Л. П. Колокольцева.

ИБ № 6386

ЛР № 010215 от 29.04.97. Сдано в набор 03.02.97. Подписано к печати 29.09.97.
Формат бумаги 84 x 108/16. Бумага офс. № 1. Гарнитура Тайме. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 36,12. Усл.кр.-отт. 36,12. Уч.-изд. л. 33,68. Тираж 5000 экз. Заказ №
1134.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Медицина» 101000, Москва.
Петроверигский пер., 6/8

ОАО «Можайский полиграфический комбинат»
143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.

ISBN 5-225-00567-5



ISBN 5-225-00567-5

© 1989, by Blackwel Scientific Publications

ISBN 0-632-01948-4

© О. Г. Яновский, перевод на русский
язык, 1998

Список авторов

- P. J. Barnes** DM, MRCP, Department of Medicine, Cardiothoracic Institute (University of London), Fulham Road, London SW3 6HP, UK.
- R. Bomford** BA, PhD, Department of Experimental Immunobiology, Wellcome Research Laboratories, Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.
- J. F. Borel** PhD, Preclinical Research, Sandoz Ltd, CH 4002, Basle, Switzerland.
- C. G. Cochrane** MD, Department of Immunology, Scripps Clinic and Research Foundation, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, C A 92037, USA.
- M. M. Dale** MB, ChB, PhD, Department of Pharmacology, University College London, Gower Street, London WC1E 6BT, UK.
- P. Davies** PhD, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Merck Institute for Therapeutic Research, Rahaway, NJ 07065, USA.
- M. M. Dawson** MSc, PhD, Paterson Institute for Cancer Research Christie Hospital and Holt Radium Institute, Manchester M20 9BX, UK.
- C. A. Dinarello** MD, Division of Experimental Medicine, Tufts University School of Medicine, 136 Harrison Avenue, Boston, MA 02111, USA.
- T.-P.D. Fan** PhD, Department of Pharmacology, University of Cambridge, Cambridge CB2 2QD, UK.
- R.J. Flower** PhD, Department of Pharmacology, School of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath, Claverton Down, Bath BA2 7AY, UK.
- J. C Foreman** MB, BS, PhD, Department of Pharmacology, University College London, Gower Street, London WC1E 6BT, UK.
- J. M. Hanson** PhD, Department of Clinical Pharmacology, Cardiothoracic Institute, Fulham, London, SW3 6HP, UK.
- G. A. Higgs** PhD, Head of Biology, Celltech Ltd, 216 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 4EN, UK.
- A.B. Kav** MB, BCh, PhD, DSc, MRCP, MRCPATH, Department of Clinical Immunology, Cardiothoracic Institute (University of London), Fulham Road, London SW3 6HP, UK.
- J.L. Mongar** PhD, Department of Pharmacology, University College London, Gower Street, London WC1E 6BT, UK.
- M. Moore** PhD, DSc, MRCPATH, Paterson Laboratories, Christie Hospital and Holt Radium Institute, Manchester M20 9BX, UK.
- J. Morley** PhD, MRCPATH, Preclinical Research, Sandoz Ltd, CH 4002, Basle, Switzerland.
- D. B. Norris** PhD, Xenova Limited, 545 Ipswich Road, Slough SL1 4EQ, UK.
- F. L. Pearce** PhD, Department of Chemistry, University College London, Gower Street, London WC1E 6BT, UK.
- H. P. Rang** MB, BS, MA, DPhil, FRS, Sandoz Institute for Medical Research, Gower Street, London WC1E 6BN, UK.
- T.J. Rising** PhD, 17 Tudor Gardens, Stoney Stratford MK11 1XX, UK.
- V. M. Rumjanek** PhD, Pesquisa Basica, Instituto Nacional de Cancer, Praca Cruz Vermelha 23, Rio de Roneiro, 20230 Brazil.
- J. A. Salmon** PhD, Department of Mediator Pharmacology, Wellcome Research Laboratories, Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK.

A.D. Sedgwick *PhD, Department of Antiinflammatory Research, Roche Products Ltd, Welwyn Garden City, Hertfordshire AL7 3AY, UK.*

J. L. Turk *MD, DSc. FRCP. FRCS. FRCPath. Department of Pathology, Royal College of Surgeons, Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PN, UK.*

R. C. Wiggins *MRCP, Department of Internal Medicine, University of Michigan School of Medicine, Ann Arbor, MI 48109, USA.*

P. C. Wilkinson *MD, Department of Bacteriology and Immunology, University of Glasgow, Glasgow G11 6NT, UK.*

T. J. WiWams *PhD, Professor of Applied Pharmacology, National Heart and Lung Institute, Dovehouse Street, London SW3 6LY.*

D. A. Willoughby *PhD, DSc, FRCPath, Department of Experimental Pathology, St Bartholomew's Hospital Medical College, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, UK.*

Оглавление

Список авторов.....	V	Глава 13. Кинины.....	139
Предисловие ко второму изданию ...	IX	I. Система образования кининов.- <i>Р. К. Виггинс, К. Г. Кохрейн (R. C. Wiggins, C. G. Cochrane)</i>	139
Предисловие к первому изданию ...	X	II. Кининовые рецепторы и сопряжение рецептор- эффектор.- <i>Х. П. Ранг (H. P. Rang)</i>	146
Список сокращений	XI	Глава 14. Лимфокины.- <i>Дж. Морлей, Дж. М. Хансон, В. М. Румьянек (J. Morley, J. M. Hanson, V.M.Rumjanek)</i>	149
Глава 1. Введение в иммунологию и патологию защитных механизмов организма.- <i>М. М. Дейл, Дж. К. Формен (M. M. Dale, J. C. Foreman)</i>	1	Глава 15. Интерлейкин- <i>l.-К.А. Динарелло (C. A. Dinarello)</i>	161
Часть 1. Клетки, участвующие в воспалении	15	Глава 16. Фактор активации тромбоцитов.- <i>Дж. Морлей (J. Morley)</i>	166
Глава 2. Тучные клетки и базофильные лейкоциты.- <i>Дж. К. Формен (J. C. Foreman)</i>	16	Резюме части 2- <i>М.М. Дейл (M.M. Dale)</i>	175
Глава 3. Нейтрофильные лейкоциты.- <i>М. М. Дейл (M. M. Dale)</i>	32	Часть 3. Воспаление	177
Глава 4. Тромбоциты - <i>Дж. К. Формен (J. C. Foreman)</i>	49	Глава 17. Сосудистые изменения при воспалении и механизмы образования отека.- <i>Т. Дж. Вильяме (T. J. Williams)</i>	178
Глава 5. Эозинофильные лейкоциты - <i>А.Б.Кей (A.B.Kay)</i>	60	Глава 18. Накопление клеток и воспаление.- <i>Я. К. Уилкинсон (P. C. Wilkinson)</i>	186
Глава 6. Мононуклеарные фагоциты.- <i>П. Девис (P. Davies)</i>	68	Глава 19. Пирогенез.- <i>Дж.К. Формен (J.C. Foreman)</i>	199
Глава 7. Лимфоциты.- <i>Дж.Л. Турк (J.L. Turk)</i>	77	Глава 20. Лейкоцитоз.- <i>М.М. Дейл (M.M.Dale)</i>	207
Глава 8. Эндотелиальные клетки сосудов.- <i>М. М. Дейл, Т-П. Д. Фан (M. M. Dale, T-P. D. Fan)</i>	87	Глава 21. Нервные механизмы воспаления дыхательных путей.- <i>П. Дж. Барнес (P.J. Barnes)</i>	216
Часть 2. Медиаторы	103	Часть 4. Влияние лекарственных препаратов на воспаление и иммунный ответ . .	225
Глава 9. Гистамин-медиатор аллергических и воспалительных реакций.- <i>М. М. Дейл, Дж. К. Формен (M. M. Dale, J. C. Foreman)</i>	104	Глава 22. Экспериментальные модели для отбора лекарственных препаратов, влияющих на реакции воспаления и гиперсенситивности.- <i>Л. Д. Седжвик, Д. А. Виллоубай (A.D. Sedgwick, D.A. Willoughby)</i>	226
Глава 10. Эйкозаноиды.- <i>Дж.А. Сал-мон, Г. А. Хиггс (J.A. Salmon, G.A. Higgs)</i>	113	Глава 23. Хромогликат. <i>Дж.К.Формен, Ф.Л.Пирс (J.C.Foreman, F.L.Pearce)</i>	235
Глава 11. Факторы хемотаксиса нейтрофилов и эозинофилов при аллергии и астме.- <i>А.Б. Кей (A.B.Kay)</i>	125		
Глава 12. Комплемент,- <i>Дж.Л. Монгар (J.L.Mongar)</i>	131		

Глава 24. Противовоспалительное действие кортикостероидов.- <i>Р. Дж. Флауэр, М. М. Дейл (Я. J. Flower, М. М. Dale)</i>	246	Глава 29. Интерфероны. - <i>М. Мур, М. М. Даусон (М. Moore, М. М. Dawson)</i>	292
Глава 25. Нестероидные противовоспалительные препараты- <i>М.М. Дейл, Дж. К. Формен (М. М. Dale, J. C. Foreman)</i>	260	Глава 30. Интерлейкин-2.- <i>М. М. Даусон, М. Мур (М. М. Dawson, М. Moore)</i>	307
Глава 26. Циклоспорин- <i>Дж. Ф. Борель (J.F.Borel)</i>	269	Глава 31. Хлорохин- <i>М. М. Дейл (М.М. Dale)</i>	314
Глава 27. Иммуносупрессивные препараты- <i>Дж. Л. Турк (J.L. Turk)</i>	280	Глава 32. Золото.- <i>Т. Дж. Райзинг, Д. Б. Норрис (Т. J. Rising, D.В. Norris)</i>	321
Глава 28. Иммунологические адьюванты- <i>Р. Бомфорд (R. Bomford)</i>	288	Глава 33. D-пеницилламин.- <i>Д. Б. Норрис, Т. Дж. Райзинг (D.В. Norris, Т. J. Rising)</i>	327
		Резюме части 4- <i>Дж.К. Формен (J.C. Foreman)</i>	332

Предисловие ко второму изданию

Первое издание этой книги было подготовлено в связи с тем, что при чтении курса иммунофармакологии соискателям степени бакалавра 3-го года обучения мы столкнулись с определенными трудностями, обусловленными отсутствием руководства, опираясь на которое студенты могли бы свободно пользоваться специальной литературой.

Второе издание, как и первое, предназначается прежде всего для студентов завершающего года обучения. Тем не менее при его подготовке мы учитывали возрастающий интерес к иммунофармакологии, а также возможность использования данного руководства в качестве вводного пособия для исследователей, работающих в других областях. Как и раньше, при изложении материала мы учитывали возможное отсутствие или недостаточность знаний по иммунологии, патологии или гистологии, поэтому в вводной главе дано представление о фармакологическом подходе к взаимодействию между организмом и патогеном при воспалительных реакциях. В этой главе схематически изложена основная часть книги, в четырех разделах которой описываются клетки, медиаторы, важнейшие местные и системные воспалительные реакции, а также различные препараты, оказывающие на них влияние.

Имунофармакология быстро развивается, и мы постарались включить в последнее издание все ее важные достижения. Одним из них является более глубокое понимание процессов сопряжения стимула и активации в клетке, особенно связанных с обменом полифосфоинозитидов и образованием вторичных мессенджеров - инозитолтрифосфата и диацилглицерола.

Некоторые аспекты механизмов передачи сигналов являются общими для многих типов клеток, поэтому при описании различных типов клеток в главах первой части неизбежны повторения. Все главы этой части написаны заново; сюда включена новая глава об эндотелиальных клетках.

В остальных частях книги значительно пересмотрены почти все главы и введены новые. Так, во вторую часть («Медиаторы») включена глава «Интерлейкин-1», а в третью часть («Феномены воспаления»)-глава, посвященная нервным механизмам, принимающим участие в воспалении. В заключительной части новыми являются главы о препаратах золота, хлорохине, иммунодепрессивных препаратах и интерлейкине-2.

М. М. Дейл, Дж.
К. Формен

Предисловие к первому изданию

Основу данной книги составляет курс иммунофармакологии для соискателей степени бакалавра 3-го года обучения на кафедре фармакологии Университетского колледжа в Лондоне. При введении данного курса мы столкнулись с определенными трудностями, связанными с отсутствием руководства, необходимого для семинарских занятий и дискуссий, опираясь на которое обучающиеся могли бы самостоятельно работать со специальной литературой. Первоначально книга писалась с целью заполнить этот пробел; однако, зная о растущем интересе к иммунофармакологии, мы предполагаем, что данное руководство может представлять определенную ценность для биологов другой специализации, начинающих работать в новой для них области. Химики и фармацевты, уровень биологических

знаний которых может быть недостаточным, также смогут воспользоваться этим руководством.

Первая глава книги написана с учетом интересов тех читателей, которые не обладают обширными знаниями по иммунологии, патологии или гистологии. В ней представлены основы фармакологического подхода к взаимодействию организма и патогена при воспалении. В этой вводной главе сжато излагается материал четырех частей книги, в которых рассматриваются различные типы клеток, медиаторы, основные местные и системные феномены воспаления, а также препараты, оказывающие на них влияние.

М. М. Дейл, Дж.
К. Формен

Список сокращений

АВФН	– астма, вызванная физической нагрузкой	4-ГЦ	– 4-гидропероксициклофосфамид
АЗ	– азатиоприн	ДАГ	– диацилглицерол
АЗКЦ	– антителозависимая клеточная цитотоксичность	ДНХГ	– динатриевый хромогликат
АЛГ	– антилимфоцитарный глобулин	ДПХБ	– 2,3-динитрохлорбензол
АМ	– адриамицин	ЕКК	– естественные клетки-киллеры
АПК	– антигенпрезентирующие клетки	ИКГВ	– изокапническая гипервентиляция
АПЛП	– антигипертензивный полярный липид почек	ИЛ-1 (2)	– интерлейкин-1 (2)
АСБ	– актинсвязывающий белок	ИФ ₃	– инозитолтрифосфат
АТФ	– аденозинтрифосфат	ИФ ₄	– инозитолтетрафосфат
АФ	– ауринофин	ИФН	– интерферон
АХ	– ацетилхолин	КОЕ-с	– колониеформирующие единицы селезенки
ББЖХ	– быстрая белковая жидкостная хроматография	Кон-А	– конканавалин А
БГЛ	– большие гранулярные лимфоциты	КПФДГ	– кальций-пирофосфатдигидрат
БК	– брадикинин	КРФ	– кортикотропин-рилизинг-фактор
БПО	– бензилпенициллоил	КСА	– колониестимулирующая активность
ВВС	– вирус везикулярного стоматита	КСФ	– колониестимулирующий фактор
ВВЭ	– венулы с высоким эндотелием	КСФГМ	– колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов
ВИП	– вазоактивный интестинальный полипептид	КШЛ	– кристаллы Шарко-Лейдена
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека	ЛК	– лимфокин(ы)
ВП	– вещество Р	ЛПК	– лимфоциты периферической крови
ВСАК-РФ	– рилизинг-фактор вещества, вызывающего сокращение аорты кролика	ЛПС	– липополисахарид
ГКГС	– главный комплекс гистосовместимости	ЛТ (В ₄ , С ₄ , D ₄)	– лейкотриен (В ₄ , С ₄ , D ₄)
ГМ-КСФ	– гранулоцито-макрофагальный колониестимулирующий фактор	МБО	– модификаторы биологического ответа
ГМП	– гистидинметионинпептид	МГП	– маргинальный гранулоцитарный пул
ГНРБ	– гуаниннуклеотид-регуляторный белок	МДВ-А	– медленно действующее вещество анафилаксии
ГОБ	– главный основной белок	МДП	– мурамилдипептид
ГОЭТЕ	– гидроксизйкозатетраеновая кислота	МДПП	– медленно действующие противоревматические препараты
ГПЭТЕ	– гидропероксиизйкозатетраеновые кислоты	МКПК	– мононуклеарные клетки периферической крови
ГСЗТ	– гиперсенситивность замедленного типа	6-МП	– 6-меркаптопурин
ГТФ	– гуанозинтрифосфат	МТ	– метотрексат
		МФ	– митогенный фактор
		МЧ	– митоген чечевицы
		НАНХ	– неадренергическая нехолинергическая иннервация

НК	- натуральные клетки-киллеры	Тлк	- Т-клетки, продуцирующие лимфокины
НРИ	- Национальный раковый институт (США)	Тп	- Т-клетки-помощники
НСПВП	- нестероидные противовоспалительные препараты	ТПХ	- реакция «трансплантат против хозяина»
НТМЗ	- натриевый тиомалат золота	Тс	- супрессорные Т-клетки
НХА	- нейтрофильная хемотаксическая активность	ТФА	- 12-0-тетрадеcanoил-форбол-13-ацетат
НХФ	- нейтрофильный хемотаксический фактор	Тц	- цитотоксические Т-клетки
ОАГ	- 1-олеоил-2-ацетилглицерол	ФАМ	- фактор активации макрофагов
ОБЭ	- основной белок эозинофилов	ФАТ	- фактор активации тромбоцитов
ОДК	- орнитиндекарбоксилаза	ФГА	- фитогемагглютинин
ОФВ ₁	- объем форсированного выдоха в секунду	ФЗТ	- фактор, замещающий Т-клетки
5-ОТ	- 5-окситриптамин	ФИМ	- фактор, ингибирующий миграцию
ОЭТЕ	- оксизйкозатетраеновые кислоты	ФИФ ₂	- фосфатидилинозитолдифосфат
ПГ	- простагландины	ФЛА ₂	- фосфолипаза А ₂
ПКА	- пассивная кожная анафилаксия	ФМА	- форбол-миристил ацетат
ПК-С	- протеинкиназа С	ФМЛФ	- Ф.мет-лей-фен
ПМЯЛ	- полиморфно-ядерные лейкоциты	ФНО	✓ фактор некроза опухоли
ПРПМЗ	- противоревматические препараты, модифицирующие заболевание	ФУМ	- фактор, угнетающий миграцию
ПСГК	- пептид, связанный с геном кальцитонина	цАМФ	- циклический аденозин-3,5-монофосфат
ПЭТЕ	- пероксизйкозатетраеновые кислоты	цГМФ	- циклический гуанозин-3,5-монофосфат
РА	- ревматоидный артрит	ЦГП	- циркулирующий гранулоцитарный пул
РСИО	- растворимый супрессор иммунного ответа	ЦМВ	- цитомегаловирус
РСЛ	- реакция смешанных лимфоцитов	ЦС-А	- циклоспорин
РФ	- ревматоидный фактор	ЦФ	- циклофосфамид
РФК	- реактивный фактор кожи	ЦФр	- цитроворум-фактор
РФФ	- ростовой фактор фибробластов	ЭАЭ	- экспериментальный аллергический энцефаломиелит
РФЭ	- релаксирующий фактор эндотелия	ЭНТ	- эозинофильный нейротоксин
СКМК	- супернатанты культур мононуклеарных клеток	ЭХФ-А	- эозинофильный хемотаксический фактор анафилаксии
СПИД	- синдром приобретенного иммунного дефицита	[Ca ²⁺] _i	- концентрация свободного внутриклеточного иона кальция
СТФ	- сывороточный тимический фактор	EDTA	- этилендиаминтетрауксусная кислота
СЭТА	- стафилококковый энтеротоксин А	EGTA	- ди-(2-аминоэтокси)-этантетрауксусная кислота
ТА ₂	- тромбоксан А ₂	IgA (D, E, G, M)	- иммуноглобулин А (D, E, G, M)
		RBL	- базофильный лейкоз крыс
		ТРА	- 12-0-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетат
		vWF	- фактор Виллебранда

1 Введение в иммунологию и патологию защитных механизмов организма

М.М. Дейл, Дж. К. Формен (M. M. Dale, J. C. Foreman)

Имунофармакология-это область биологии, которая объединяет иммунологию, патологию и фармакологию. Она касается фармакологического подхода к взаимодействию организма с угрожающим его существованию агентом или внедрившимся патогеном.

Организм млекопитающего при проникновении патогена (организма, вызывающего заболевание) может воспользоваться обширным арсеналом защитных средств (реакций). При успешном развитии защитных реакций повреждение или быстро устраняется (например, заживление абсцесса), или вовсе не проявляется (например, инфекция оспы в вакцинированном организме). При избыточном или неадекватном развитии эти реакции способны вызвать повреждение организма и могут сами по себе составлять часть патологического процесса (например, при долевой пневмонии или ревматоидном артрите). Впечатляет многообразие химических медиаторов, продуцируемых организмом, которые контролируют или модулируют защитные реакции; это является одним из главных аспектов взаимодействия организм - патоген, представляющего особый интерес для фармаколога.

В сущности иммунофармакологический подход является тем же подходом, который доказал свою эффективность при изучении химических передатчиков нервного импульса в вегетативной и периферической нервной системе. При этом использование препаратов (например, эзерина, атропина, тубокурарина) оказалось совершенно необходимым для исследования возможной роли химического передатчика (ацетилхолина). Полученная таким образом информация способствовала созданию более совершенных препаратов (гексаметоний, сукцинилхолин и др.), которые в свою очередь использовались не только для лечения, но и как инструменты, облегчающие дальнейшее познание природы нервной передачи и соответствующего развития новых лекарств. И этот процесс продолжается.

При взаимодействии организма и патогена проблема представляется более сложной ввиду

многочисленности медиаторов и реактивных клеток, однако ценность фармакологического подхода и здесь может быть значительной. Так, например, исследование механизма действия ацетилсалициловой кислоты (препарата, внедренного эмпирически) позволило определить роль метаболитов арахидоновой кислоты в воспалении и создать новые ценные препараты.

В первой главе в упрощенной форме описывается ряд местных событий, происходящих при проникновении микроорганизмов в ткани млекопитающих, а также дается краткое (схематическое) изложение остальных частей книги. Описывается гипотетическая ситуация, которая, на первый взгляд, напоминает стафилококковую инфекцию, вызывающую острую воспалительную реакцию, например абсцесс. Сначала приводится описание врожденных реакций, протекающих без участия иммунологических механизмов, а затем рассматривается их совершенствование, приводящее к большей избирательности с помощью адаптивной реакции - специфического иммунного ответа. Однако следует принять во внимание, что нашей основной задачей в данном контексте является описание чрезмерных или неадекватных реакций, возникающих при проникновении не только микроорганизмов, но и чужеродных веществ, обозначаемых здесь как «повреждающие агенты». Особое внимание уделяется двум заболеваниям, а именно: бронхиальной астме и ревматоидному артриту, поскольку лежащие в их основе механизмы еще не вполне ясны, а лечение далеко не всегда бывает адекватным. Некоторые аспекты астмы обсуждаются в главах 11, 16 и 21, а краткое описание патологии при ревматоидном артрите дано в главе 31.

Воспалительные реакции

Макроскопическими признаками воспалительной реакции являются покраснение, отек, жар, боль и нарушение функции. Примером исслед-

него может служить ограничение подвижности в воспаленном суставе или сужение дыхательных путей с соответствующим затруднением дыхания при тяжелой астме.

Компонентами воспалительной реакции являются как врожденные (иммунологически неспецифичные), так и адаптивные (иммунологически специфичные) реакции. Необходимо подчеркнуть, что при этом существует ряд резервных систем, поэтому любой ответ может генерироваться несколькими путями, которые следует учитывать при оценке реакции, наиболее критической для выживания.

Врожденные реакции

Врожденные реакции в сущности можно разделить на сосудистые и клеточные. Медиаторы могут иметь плазменное (при сосудистых изменениях) или клеточное происхождение и в свою очередь могут влиять на сосудистые и клеточные реакции.

Изменения сосудов и медиаторы плазмы

Сосудистые изменения начинаются немедленно и развиваются в течение первых нескольких часов. Они включают расширение кровеносных сосудов с увеличением кровенаполнения и последующим замедлением кровотока, а также повышение сосудистой проницаемости и экссудацию плазмы. Вазодилатация обеспечивается рядом медиаторов, образующихся при взаимодействии микроорганизма с клетками (гистамин, простагландины E_2 и I_2 , фактор, активирующий тромбоциты, и др.) и действующих на сфинктеры малых артериол и прекапилляров. Повышенная проницаемость сосудов регулируется факторами, контролирующими экссудацию из посткапиллярных венул, за исключением случаев травматического повреждения, когда экссудация может наблюдаться на уровне капилляров. В начальной стадии повышения сосудистой проницаемости принимают участие те же медиаторы (гистамин, фактор, активирующий тромбоциты, и т.д.). Нейтрофилы, ассоциированные со стенками посткапиллярных венул, вовлекаются в процесс на более поздней и более продолжительной стадии. Значение этих процессов заключается в локальном увеличении медиаторов, необходимых для реакции против патогена. В плазме содержатся вещества, имеющие важное значение для воспалительной реакции; повышение проницаемости обеспечивает их

выход в необходимую область. Среди этих веществ компоненты четырех ферментных каскадов: системы коагуляции; фибринолитической системы; системы комплемента и кининовой системы. Для активации всех этих систем необходим ограниченный протеолиз. Сосудистые реакции и контролирующие их медиаторы описаны в главе 17.

Жидкий экссудат адсорбируется в лимфатические сосуды, унося с собой микроорганизмы из очага воспаления или их продукты; затем он попадает в лимфатические узлы или лимфоидную ткань, где могут начаться иммунные реакции (см. ниже).

Система коагуляции состоит из ряда белков, большинство из которых является проферментами. Они образуют каскад, где активация небольшого количества первого профермента (фактора Хагемана, или XIII фактора свертываемости) запускает гораздо большее количество второго профермента и т. д. Таким образом, реакция быстро усиливается, в результате чего столь же быстро достигается эффективная концентрация главного фермента-тромбина. Тромбин действует на растворенный в плазме фибриноген, вызывая образование нитей фибрина, формирующих сеть. Когда этот процесс происходит в цельной крови, образовавшаяся сеть служит основой кровяного сгустка, состоящего из клеток крови, главным образом эритроцитов, задержанных сетью. Если же взаимодействие организм-патоген происходит в тканях, где мало эритроцитов, то фибрин, выпадая, ограничивает распространение инфекции.

Активированный фактор Хагемана, помимо запуска каскада, формирующего кровяной сгусток, запускает ферментативный каскад-фибринолитическую систему. Это достигается активацией фермента пламина, разрушающего фибрин. При разрушении фибрина высвобождаются пептиды, являющиеся хемотаксантами лейкоцитов. Фактор Хагемана активирует также кининовую систему (см. ниже). Плазмин оказывает влияние на активированный фактор Хагемана, делая его более эффективным для запуска кининовой системы, но менее эффективным в отношении свертывающего каскада.

Система комплемента также является ферментативным каскадом. При ее активации образуется ряд факторов, которые *in vitro* оказывают сильное действие на кровеносные сосуды, лейкоциты, клетки различных тканей и микроорганизмы. Каскад состоит из девяти

главных компонентов, обозначаемых как C1-C9. Важным событием в активации каскада является активация C3, находящегося в плазме в относительно высокой концентрации (более 1 мг/мл). C3 может активироваться двумя основными путями: а) классическим-через связывание антител с C1 и б) альтернативным - через другие неантительные стимулы, такие как продукты микроорганизмов (полисахариды клеточной стенки дрожжей, эндотоксины и др.). Продукты активации C3 обладают разнообразными эффектами. C3a стимулирует секрецию медиаторов тучными клетками. C5a оказывает хемотаксическое действие на лейкоциты и активирует их. C3b прикрепляется к поверхности микроорганизмов, что облегчает их поглощение лейкоцитами. Компоненты комплемента могут также стимулировать секрецию лизосомных ферментов у макрофагов и мобилизацию лейкоцитов из костного мозга. «Анафилатоксины» (C3a и C5a) обладают прямым спазмогенным действием на гладкие мышцы.

Прикрепление более поздних компонентов комплемента (C5-C9) к бактериальной стенке или клеточной мембране приводит к лизису бактерии или клетки. Таким образом, комплемент способен вызывать гибель внедрившихся бактерий и многоклеточных организмов, а иногда и клеток организма хозяина.

Центральное событие в каскаде комплемента - активация C3; она может быть вызвана основными ферментами коагуляционного и фибринолитического каскадов (тромбин и плазмин), а также может запускаться ферментами лейкоцитов.

Биологическая активность системы комплемента детально обсуждается в главе 12.

Следующим ферментативным каскадом является кининовая система. Профермент, находящийся в крови, может активироваться фактором Хагемана, плазмином, лизосомными протеазами нейтрофилов и макрофагов или просто разведением. В результате образуется протеолитический фермент калликреин, который отщепляет от α -глобулина плазмы активный полипептид кинин. Кинины-мощные вазодилататоры; кроме того, они повышают проницаемость сосудов и вызывают боль. Показано, что кинины могут стимулировать образование простагландинов (см. ниже); калликреин является фактором хемотаксиса нейтрофилов *in vitro*.

Кининовая система и ее взаимодействие с фактором Хагемана описаны в главе 13. На

рис. 1 дана схема взаимодействия всех четырех систем.

Другие медиаторные системы, имеющие клеточное происхождение, описаны ниже.

Клеточные реакции

Некоторые клетки, участвующие в описываемых событиях, уже присутствуют в тканях (клетки сосудистого эндотелия, тучные клетки, тканевые мононуклеарные фагоциты), другие же попадают в зону воспаления из крови (тромбоциты и лейкоциты). Лейкоциты, или клетки белой крови, являются активно подвижными клетками. Они могут быть двух типов:

1) полиморфно-ядерные клетки (с ядром, разделенным на доли), которые в зависимости от окраски гранул цитоплазмы подразделяются на нейтрофилы, эозинофилы и базофилы; их также называют гранулоцитами;

2) мононуклеарные клетки (с одиночным неразделенным ядром); они подразделяются на моноциты и лимфоциты.

Тромбоциты, которые в строгом значении этого слова не являются клетками ввиду отсутствия в них ядер, также принимают участие в воспалительных реакциях и могут играть важную роль при астме.

Тучные клетки. Эти клетки уникально расположены в местах возможного внедрения в ткани патогенов или повреждающих агентов: вблизи поверхности кожи, возле слизистых мембран, выстилающих полости тела, и вокруг кровеносных сосудов. Тучные клетки способны секретировать или образовывать множество медиаторов, которые не только изменяют сосудистые и клеточные реакции, но и влияют на некоторые факторы плазмы. В качестве структурных элементов мембраны тучные клетки имеют рецепторы для антител и компонентов комплемента. Секреция медиаторов мастоцитами происходит при их активации через эти рецепторы и под воздействием факторов нейтрофилов. Высвобождение медиаторов может происходить и после прямого физического повреждения клеток.

Основным веществом, выделяемым тучными клетками, является гистамин. Среди других медиаторов следует отметить сульфатированные пептидогликаны (хондроитин или гепарин), которые могут тормозить свертывание крови; они также нейтрализуют некоторые фармакологически активные основные протеины, выделяемые нейтрофилами и другими

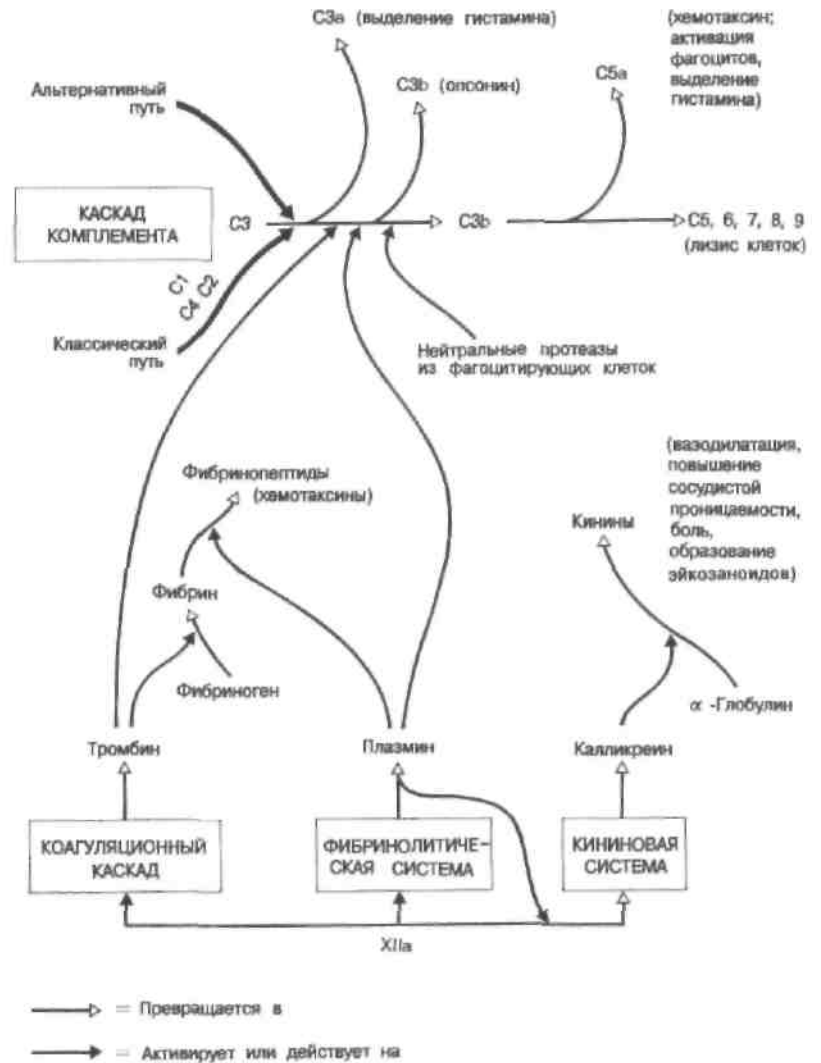


Рис. 1. Взаимодействие некоторых медиаторов плазмы.

Ряд веществ действует, как C3 конвертазы, в том числе нейтральные протеазы нейтрофилов и макрофагов. XIIa (активированный фактор Хагемана) может активировать три главные ферментативные системы. Сформировавшийся плазмин увеличивает образование кининов и подавляет коагуляционный каскад.

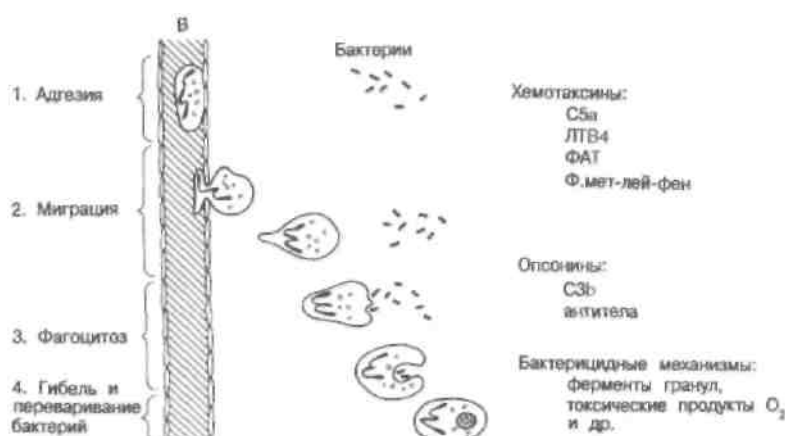
клетками. Тучные клетки описаны в главе 2.

Полиморфно-ядерные лейкоциты (полинуклеары). Эти клетки первыми из лейкоцитов появляются в зоне воспаления. В крови человека они составляют 60% всех лейкоцитов. Полиморфно-ядерные лейкоциты представляют собой конечные клетки, неспособные к делению, с пониженным синтезом белка и короткой продолжительностью жизни. В их цитоплазме содержатся по крайней мере два типа гранул. Полинуклеары прикрепляются к стенкам посткапиллярных венул и активно мигрируют из кровеносного сосуда в зону внедрения патогена. Нейтрофилы поглощают и переваривают микроорганизмы. На поверхности

нейтрофилов и эозинофилов имеются рецепторы к одному из продуктов активации комплемента, который прикрепляется к поверхности бактерий или многоклеточного паразита. Этот продукт (C3b) образует мостик между полиморфно-ядерным лейкоцитом и внедрившимся организмом. (Дальнейшая связь осуществляется антителом; см. ниже.) Для гибели микроорганизма требуется дыхательный взрыв, во время которого возрастает потребление кислорода и образуются токсические продукты кислорода. В этом процессе участвуют также ферменты цитоплазматических гранул; кроме того, возможно временное ощелачивание лизосомоподобных азурофильных гранул. Нейт-

Рис. 2. Схематически представленные четыре этапа участия нейтрофилов в острой воспалительной реакции на бактерии в ткани, прилежащей к посткапиллярной венуле (В).

- 1 - прикрепление к эндотелию;
- 2- миграция по градиенту концентрации одного (или более) хемотаксина;
- 3 - фагоцитоз организмов, опсонизированных СЗб или IgG;
- 4- гибель и переваривание микроорганизмов.



рофилы содержат в этих гранулах набор переваривающих ферментов, которые активны практически против всех структурных компонентов большинства микроорганизмов. Многие из этих ферментов эффективнее всего действуют при низких значениях рН, характерных для лизосом. В определенных условиях нейтрофилы могут активно секретировать содержимое своих гранул. При этом выделяются и другие ферменты, которые действуют эффективнее при нейтральных значениях рН жидкостей и способны расщеплять компоненты комплемента и запускать кининовый каскад. Таким образом, нейтрофилы потенциально обеспечивают еще один путь активации систем образования медиаторов. При неадекватном запуске секреторного процесса ферменты и другие активные вещества гранул могут вызвать повреждение собственных тканей организма. При этом из полиморфно-ядерных лейкоцитов могут выделяться и токсические продукты кислорода. Нейтрофилы необходимы для повышения проницаемости посткапиллярных венул.

Схема действия нейтрофилов дана на рис. 2.

Эозинофилы наиболее важны для защиты от гельминтов и других многоклеточных организмов. Базофилы по своим функциям близки к тучным клеткам.

Нейтрофилы описаны в главе 3, эозинофилы - в главе 5, базофилы и тучные клетки - в главе 2. Некоторые аспекты ответа лейкоцитов на инфекцию обсуждаются в главах 17, 18, 20.

Моноциты. Моноциты появляются в зоне воспаления на поздней стадии реакции, многими часами позднее полиморфно-ядерных

лейкоцитов. В тканях они превращаются в макрофаги (буквально - «большие пожиратели» в отличие от полиморфно-ядерных лейкоцитов, которые первоначально назывались микрофагами, или «малыми пожирателями»). В различных тканях обнаруживаются похожие клетки, принадлежащие к категории мононуклеарных фагоцитов. Предположительно они происходят из моноцитов крови. Эти клетки поглощают не только микроорганизмы, но и обломки тканей, а также мертвые полинуклеары. (Они также играют роль в представлении антигенного материала лимфоцитам при инициации иммунного ответа; см. ниже.) Моноциты, помимо лизосомных ферментов, способны секретировать компоненты комплемента, простагландины, тканевой фактор, запускающий каскад свертывания крови, интерферон, фактор, стимулирующий фибробласты, интерлейкин-1 и факторы, изменяющие активность лимфоцитов. Кроме того, они секретируют факторы, стимулирующие рост кровеносных сосудов, что имеет важное значение для репаративных процессов. При стимуляции глюкокортикоидами моноциты секретируют липокортин, полипептид, предотвращающий избыточную воспалительную реакцию (см. гл. 24). Мононуклеарные фагоциты описаны в главе 6; некоторые аспекты их действия освещены также в главах 14, 15, 18.

Эндотелиальные клетки сосудов. В настоящее время показано (в отличие от ранее существовавших представлений), что эндотелиальные клетки сосудов играют активную роль в воспалительных реакциях. Клетки эндотелия малых артериол участвуют в расширении сосудов и в контроле перехода плазмы

и клеток в область воспаления, а клетки эндотелия посткапиллярных венул активно регулируют поток экссудата. Эндотелиальные клетки обладают обширным набором рецепторов (например, для гистамина, ацетилхолина, интерлейкина-1 и др.), способны выделять ряд мощных сосудорасширяющих веществ (простаглин, релаксирующий фактор эндотелия), а также синтезировать и секретировать многие вещества, играющие значительную роль в воспалительных реакциях (фактор активации тромбоцитов, активатор пламиногена, интерлейкин-1). Эндотелиальные клетки описаны в главе 8.

Тромбоциты. Тромбоциты являются главными участками гемостаза; кроме того, увеличивается число доказательств их способности к секреции ряда медиаторов, а также их возможной роли в некоторых воспалительных реакциях, например во второй стадии астмы. Глава 4 посвящена тромбоцитам.

Адаптивные реакции

Адаптивные, или иммунные, реакции могут быть противопоставлены врожденным реакциям, описанным выше. Иммунные реакции зависят от лимфоцитов. Эти клетки были охарактеризованы Rich как «флегматичные статисты, наблюдающие турбулентную деятельность фагоцитов»; в действительности же они являются ключевыми клетками в специфических иммунных ответах, поскольку повышают эффективность врожденных или иммунологически неспецифических реакций. В организме млекопитающих существует множество различных клонов лимфоцитов с распознающими сайтами для разнотипных антигенов (белки или полисахариды на микроорганизмах и других паразитах или же любой чужеродный материал).

Понимание основных иммунологических закономерностей совершенно необходимо в иммунофармакологии. Для начинающих изучение иммунофармакологии в конце главы дан список рекомендуемых вводных пособий. Здесь же будут приведены краткие сведения по иммунологии, которые необходимы для понимания явлений, рассматриваемых в книге.

В упрощенной интерпретации эффекторная фаза специфического иммунного ответа, которой здесь уделяется особое внимание, состоит из двух компонентов: гуморального (или антителоопосредуемого) и клеточно-опосредуемого ответов.

Лимфоциты могут быть разделены на две основные группы: В-клетки, ответственные за продукцию антител; Т-клетки, отвечающие за регуляцию многих иммунных реакций, в частности за клеточно-опосредованные реакции.

В постнатальный период, вероятно, все лимфоциты происходят из полипотентной стволовой клетки костного мозга. После поступления в циркуляцию некоторые лимфоциты попадают в тимус, где они проходят «обучение» (возможно, включающее взаимодействие с тимическими гормонами) и где в результате пролиферации и дифференциации преобразуются в клетки, имеющие определенные особенности. Их называют Т-клетками, или тимусзависимыми клетками. Покидая тимус, они оседают в селезенке и лимфатических узлах, концентрируясь в Т-зависимых областях. Большинство Т-клеток живет долго. Находясь вне Т-зависимых областей, они постоянно циркулируют, выходя из кровеносного русла через вены в ткани лимфоидных органов, а затем через эфферентные лимфатические сосуды и грудной лимфатический проток вновь входят в систему кровообращения. Выделяют четыре главные подгруппы Т-клеток. Две из них: цитотоксические Т-клетки (Т-клетки) и Т-клетки, продуцирующие лимфокины (Тлк-клетки), участвуют в эффекторной фазе иммунного ответа (см. ниже). Т-клетки-помощники (Тп-клетки) и супрессорные Т-клетки (Тс-клетки) вовлекаются в сложную цепь регуляции В- и других Т-клеток, усиливая (Тп) или подавляя (Тс) их активность во время начальной реакции на антиген, в индуктивной фазе иммунного ответа (рис. 3 и 4).

В-лимфоциты не зависят от тимуса и обнаруживают тенденцию к концентрации в совершенно иных, чем у Т-лимфоцитов, местах селезенки и лимфатических узлов.

При первом контакте с антигеном распознающие его лимфоциты начинают делиться, образуя большое количество клеток, способных распознавать антиген и реагировать на него; это является индуктивной фазой (см. рис. 3 и 4). Некоторые лимфоциты участвуют в антитело- и клеточно-опосредованных реакциях (эффektorная фаза; см. рис. 3 и 4), другие же образуют популяцию антигенчувствительных клеток памяти. При второй экспозиции с антигеном клетки памяти обеспечивают более быстрый и сильный иммунный ответ.

События индуктивной фазы и регуляция иммунного ответа очень сложны и пока не вполне ясны. Взаимодействие различных типов

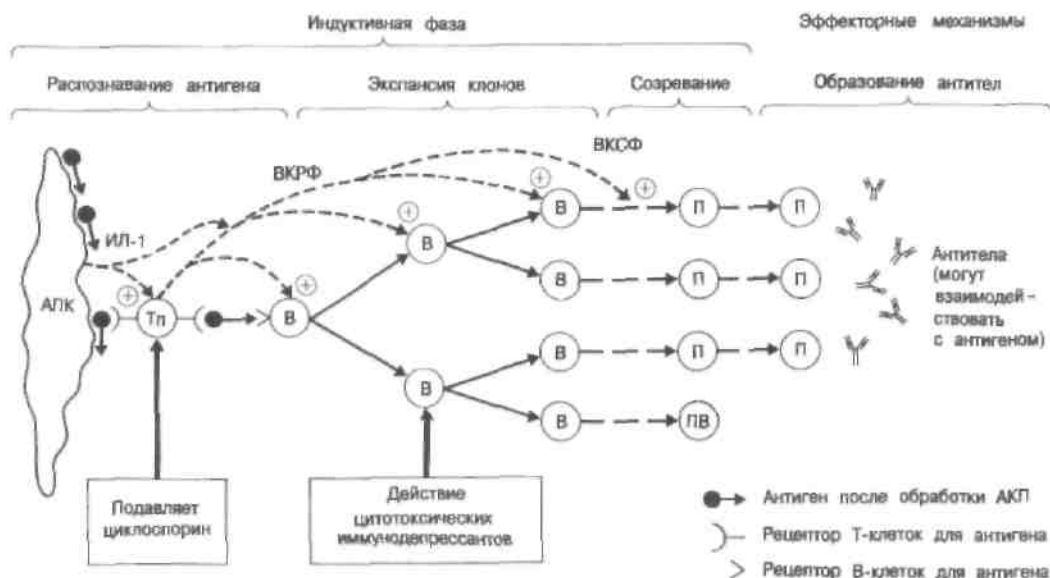


Рис. 3. Развитие антителоопосредованного иммунного ответа. Указаны точки действия фармакологических препаратов. Тп - Е-клетка-помощник; АПК-антигенпрезентирующая клетка; В-В-лимфоциты; П- плазматическая клетка; ПВ-В-клетка памяти; ИЛ-1 - интерлейкин-1; ВКРФ-ростовой фактор В-клеток; ВКСФ-фактор созревания В-клеток [Rang, Dale-Pharmacology, 1987].

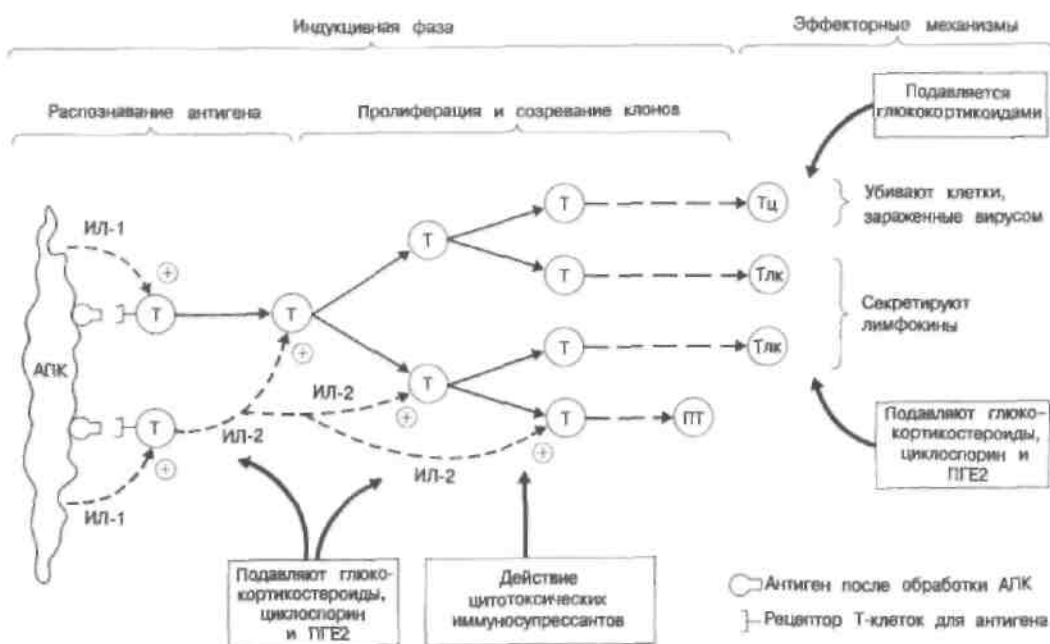


Рис. 4. Этапы развития клеточно-опосредованного иммунного ответа. Указаны точки действия фармакологических препаратов, влияющих на эти этапы. Т-Т-лимфоциты; Тц-цитотоксические Т-клетки; Тлк-Т-клетки, продуцирующие лимфокины; ИЛ-1 - интерлейкин-1; ПТ-Т-лимфоциты памяти; АПК-антигенпредставляющие клетки [Rang, Dale.- Pharmacology, 1987].

клеток включает распознавание не только антигена, но и молекул, кодируемых генами главного комплекса гистосовместимости. Не менее важное значение имеют растворимые факторы, образуемые одними клетками и действующие на другие. Участки антител, которые распознают и связывают антигены (идио-типы), могут сами являться антигенами и вызывать образование антител (антиидиотипические антитела). Взаимодействие идиотип-антиидиотип имеет такое же значение в регуляции иммунного ответа, как и сложные взаимоотношения Т-клеток-помощников и супрессоров. В данной книге представлена упрощенная версия регуляции иммунного ответа (см. рис. 3 и 4).

Индуктивная фаза иммунного ответа

Антигены, проникшие в организм, попадают в регионарные лимфатические узлы через лимфатические сосуды. В них антиген представляется лимфоцитам на поверхности фагоцитирующих клеток, названных антигенпредставляющими, или антигенпрезентирующими (АПК; см. рис. 3 и 4). Хотя существуют различные типы антигенпрезентирующих клеток, для распознавания антигена лимфоцитами в общем случае необходимо, чтобы он был представлен вместе с продуктами генов главного комплекса гистосовместимости II типа. Эти продукты находятся на поверхности АПК, и их присутствие требуется для Т-клеточного распознавания антигена (в отличие от В-клеточного распознавания). Макрофаги тоже способны представлять антигены, но только после их фагоцитоза и обработки. АПК, представляя антиген лимфоцитам, выделяют растворимый фактор интерлейкин-1, который облегчает их ответ. (Интерлейкин-1 обладает и другими эффектами, а также является важным медиатором при некоторых хронических воспалениях. Детальное описание интерлейкина-1 дано в главе 15.)

Индукция гуморального ответа зависит от типа антигена. Некоторые типы антигенов (например, повторяющиеся субъединицы пневмококковых полисахаридов) могут быть прямо представлены В-клетками, которые распознают антигены (т. е. обладают специфическими рецепторами к данным антигенам). У В-клеток рецепторы к антигену являются молекулами антител (см. ниже), и взаимодействие между антигеном и рецепторами приводит к образованию антител. Для большин-

ства антигенов необходим сложный кооперативный процесс между Тп- и В-клетками. Этот процесс включает в себя одновременное распознавание различных частей молекулы антигена Тп- и В-клетками, что сопровождается выделением растворимых факторов из Т-клеток (см. рис. 3). Эти факторы делают В-клетки способными к пролиферации и созреванию в антителопродуцирующие клетки, причем синтезируемые антитела не отличаются от рецепторов данного клона В-клеток. Интерлейкин-1, выделяемый АПК, участвует как в прямом В-клеточном ответе, так и в Тп/В-кооперативном ответе на антиген.

При индукции клеточного иммунитета Т-клетки со специфическими рецепторами к антигену активируются, как описано выше, с помощью антигена, представляемого АПК, и интерлейкина-1, выделяемого АПК (см. рис. 4). Активированные Т-клетки в свою очередь выделяют растворимый фактор интерлейкин-2, который представляет собой ростовой фактор Т-клеток. Под его действием начинается пролиферация Т-клеток, у которых индуцированы рецепторы к интерлейкину-2. В результате этого процесса могут образовываться Тц- или Тлк-лимфоциты. (Интерлейкин-2, возможно, также участвует в пролиферации В-клеток.)

Противовоспалительные стероиды (см. главу 24) и иммуносупрессивный препарат циклоспорин (см. главу 26) подавляют этот процесс на стадии продукции и действия интерлейкина-2. Цитотоксические иммунодепрессанты (см. главу 27) подавляют иммунные реакции на стадии пролиферации В- и Т-клеток. Эйкозаноиды (см. главу 10) предположительно обладают регуляторными свойствами в отношении этих процессов; простагландины серии Е тормозят пролиферацию лимфоцитов, вероятно, подавляя выделение интерлейкина-2. Лейкотриен В₄ может участвовать в регуляции активации Т-клеток.

Эффекторная фаза иммунного ответа

Гуморальный иммунный ответ: антитела и В-лимфоциты. Высокая специфичность гуморального ответа на чужеродные молекулы или патогены определяется антителами. Для понимания механизмов, обеспечивающих такую специфичность, необходимо знание структуры этих молекул. Детальное описание строения и функции антител дано в руководствах по иммунологии.

Антитела-это белки плазмы, относящиеся к классу гамма-глобулинов. Они обладают двумя функциями: а) распознавание и взаимодействие с антигеном (молекулярная структура, которая идентифицирует внедрившийся организм или молекулу как чужеродную; б) активация защитных механизмов макроорганизма, например системы комплемента или клеток воспаления. Эти две функции обеспечивают специфичность реакции организма на чужеродный материал. Способность антител выполнять указанные функции определяется их структурными характеристиками.

Все молекулы различных антител имеют одинаковую структуру основной единицы, которая показана на рис. 5. В нее входят две тяжелые и две легкие цепи, соединенные сульфгидрильными связями. Существует два типа легких цепей-к и Х и пять типов тяжелых цепей. Каждая цепь (легкая или тяжелая) содержит константную область, которая определяет тип или класс антител (IgG, IgE и т.д.). Так, молекула антитела может иметь две к-легкие цепи и две е-тяжелые цепи, Такой иммуноглобулин обозначается как IgE в связи с наличием е-тяжелых цепей, хотя в IgE

могут быть л,-цепи вместо к-легких цепей, Класс, к которому принадлежит антитело, определяет способ его взаимодействия с защитными силами организма.

На N-конце легких и тяжелых цепей находится переменная область. Она придает молекуле способность распознавать другие молекулы. Молекулы антител с соответствующими структурами переменных областей могут распознавать и реагировать почти на все чужеродные молекулы, попадающие в организм. В-лимфоциты распознают чужеродные молекулы (антигены) иммуноглобулиновыми рецепторами на своей поверхности. Рецепторные иммуноглобулины В-клеток практически не отличаются от иммуноглобулинов, секретруемых плазматическими клетками, в которые они превращаются в результате пролиферации и дифференциации, Как видно на рис. 5, молекула иммуноглобулина имеет Y-подобную конфигурацию, Переменные области расположены на вершинах плеч Y. Две Fab-области содержат антигенсвязывающие участки, поэтому молекула бивалентная. Ствол Y или Fc-область является частью молекулы, которая взаимодействует со

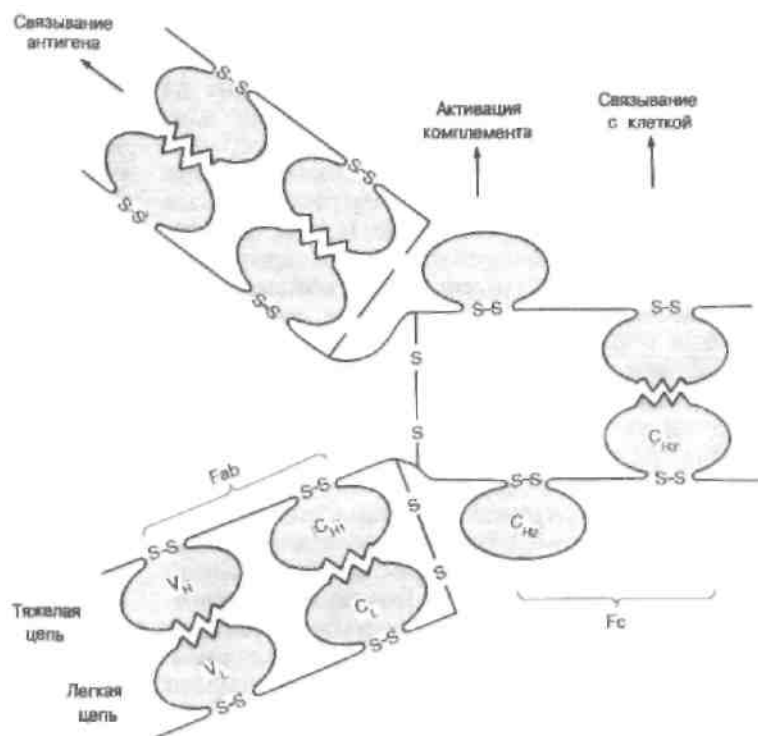


Рис. 5. Основная структура иммуноглобулина.

Каждая молекула содержит две тяжелые (H) и две легкие (L) пептидные цепи с константными (C) и переменными (V) последовательностями. Разные домены выполняют специфические функции: например, C_{H2} участвует в активации комплемента. (По Roitt, 1980.)

структурами других механизмов иммунитета организма. Это взаимодействие включает связывание и активацию комплемента, присоединение к тучным клеткам, нейтрофилам, макрофагам и базофилам. Клетки, которые связывают антитела через Fc-фрагменты, имеют мембранные рецепторы, специфические к определенному классу антител. Тучные клетки, обладающие рецепторами к Fc-ε, связывают только IgE; нейтрофилы и макрофаги с помощью рецепторов к Fc-γ взаимодействуют с **IgG**. IgG, IgA и особенно IgM активируют комплемент в отличие от IgA (см. выше, а также главу 12).

IgG присоединяется к бактериям и некоторым многоклеточным организмам, в результате чего становятся возможными их распознавание, повреждение и поглощение нейтрофилами и макрофагами (фагоцитирующие клетки), которые имеют рецепторы к IgG и C3b (см. выше). IgG имеет важное значение не только в процессах прикрепления, но и в поглощении. Помимо участия в процессах фагоцитоза, IgG способен к нейтрализации вирусов и токсинов. IgE присоединяется к гистаминсодержащим тучным клеткам и базофилам и опосредует высвобождение гистамина при иммунных реакциях против гельминтов, а также при некоторых аллергических реакциях (см. ниже).

IgA является димером, т. е. он состоит из двух Y-подобных единиц. Его функции аналогичны функциям IgG, однако IgA содержится не только в плазме, но и в жидких секретах на поверхности тела, например в слизистых оболочках дыхательных путей. IgA на поверхности тела может предупреждать проникновение некоторых антигенов в организм.

IgM, являющийся пентамером, синтезируется как первый антигенспецифический иммуноглобулин при любом иммунном ответе; затем он замещается IgG.

Функция IgD неизвестна, его идентифицируют среди иммуноглобулинов других классов при иммуноэлектрофорезе белков плазмы.

Из этого краткого описания видно, что иммуноглобулины, обладая двумя активными структурами, способны при помощи одной распознавать чужеродные молекулы (антигены), а с помощью другой активировать одну или несколько защитных систем организма. Структура тяжелых цепей определяет место и тип запускаемого защитного ответа организма, а структура переменных областей тя-

желых и легких цепей ответственна за антигенную специфичность.

Посредством антител различные описанные здесь защитные реакции организма (более подробно они рассматриваются в следующих главах) могут быть направлены на специфическую мишень.

Т-лимфоциты и клеточно-опосредованные иммунные реакции. Т-лимфоциты (Т-клетки) несут на своей поверхности рецепторы, распознающие чужеродный материал (антигены) (см. рис. 4). Эти рецепторы не являются антителами, хотя их функция аналогична функции антител, формирующих рецепторы В-лимфоцитов. При развитии клеточно-опосредованного иммунного ответа некоторые Т-клетки (Т_H или цитотоксические), действуя как клеткоубийцы, вызывают гибель клеток собственного организма, ставших чужими, например, при вирусной инфекции или опухолевой трансформации. Для этого необходимо, чтобы Т-клетки распознали на поверхности клеток не только вирусные белки, но и некоторые продукты генов главного комплекса гистосовместимости. Для цитотоксического эффекта также требуется совместное действие макрофагов.

Другие Т-клетки при стимуляции продуцируют медиаторы, называемые лимфокинами. Лимфокины активируют и регулируют реакции других клеток (см. ниже).

Таким образом, специфические иммунные клеточно-опосредованные и гуморальные реакции могут накладываться на иммунологически неспецифичные сосудистые и клеточные реакции (описаны выше), делая их не только более эффективными, но и направленными против конкретного внедрившегося патогенного агента. Важной характеристикой специфического иммунного ответа является значительное увеличение клеточного клона, запрограммированного на конкретный антиген после первого контакта с ним. Поэтому при повторном контакте с данным антигеном формируется ускоренный и более эффективный ответ. В некоторых случаях вторичный иммунный ответ усиливается настолько, что в последующем микроорганизмы теряют способность проникать в ткань.

Медиаторы клеток

Сосудистые и клеточные события в зоне воспаления, а также системные проявления воспалительных реакций контролируются различными медиаторами. Выше упоминались ме-

диаторы плазменного происхождения-компоненты комплемента, кинины, компоненты каскада свертывания и фибринолитическая система. В воспалительной реакции участвуют и клеточные медиаторы, которые продуцируются как клетками организма (эйкозаноиды, фактор активации тромбоцитов, гистамин, ин-терлейкин-1, лимфокины), так и бактериальными клетками (хемотаксический фактор ф. мет-лей-фен, бактериальный пептид, описанный в главе 3). Медиаторы клеток микроорганизма кратко описаны ниже, а детально - в специально посвященных им главах книги.

Эйкозаноиды. Еще одна важная медиаторная система образуется при стимуляции или повреждении клеток, участвующих в воспалении. Эйкозаноиды формируются из арахидоновой кислоты, входящей в состав фосфолипидов клеточных мембран. Эта ненасыщенная жирная кислота высвобождается под действием липаз, в частности фосфолипазы A_2 . Арахидоновая кислота может метаболизироваться несколькими путями, причем выбор метаболизма зависит главным образом от типа клеток.

Один из путей метаболизма приводит к образованию: тромбосана, который обладает сосудосуживающим действием и вызывает агрегацию тромбоцитов; простаглицина, который имеет сосудорасширяющий эффект и дает дезагрегацию тромбоцитов; различных простаглицлинов. Простаглицлины Е вызывают боль, расширение сосудов и потенцируют действие веществ, повышающих сосудистую проницаемость. Кроме того, они подавляют активность некоторых клеток, участвующих в воспалении. Последняя активность связана со способностью ПГЕ повышать уровень цАМФ и вследствие этого - активировать циклическую АМФ-киназу. Простаглицлины F вызывают спазм гладких мышц бронхов. Направление метаболизма арахидоновой кислоты в сторону образования простаглицлинов начинается с действия циклооксигеназного фермента, причем данный путь является основным для метаболизма арахидоната в макрофагах.

Другой метаболический путь начинается с действия липоксигеназы и приводит к повышению содержания сначала пероксиэйкозатетраеновых кислот (ПЭТЕ), а затем оксиейкозатетраеновых кислот (ОЭТЕ) и лейкотриенов. Один из них-лейкотриен V_4 (ЛТВ $_4$)-является очень мощным хемотаксическим фактором нейтрофилов (см. рис. 2), эозинофилов и макрофагов; кроме того, он стимулирует секрецию

нейтрофилов. Другие лейкотриены (ЛТС $_4$ и ЛТД $_4$) обладают сильным бронхосуживающим действием. Вместе они составляют вещество, известное ранее под названием «медленно реагирующее вещество анафилаксии». Полиморфно-ядерные лейкоциты метаболизируют арахидонат главным образом с образованием ОЭТЕ и ЛТВ $_4$, а фагоцитирующие макрофаги, эозинофилы и, вероятно, тучные клетки-ЛТС $_4$, ЛТД $_4$ и ПГ. Глава 10 посвящена эйкозаноидам.

Фактор активации тромбоцитов (ФАТ). Этот липид, образующийся под действием фосфолипазы A_2 на клетку, также является важным медиатором. Он высвобождается из стимулированных эозинофилов, нейтрофилов и тромбоцитов. Несмотря на свое название, ФАТ является фактором хемотаксиса нейтрофилов и стимулирует их секрецию (см. рис. 2), вызывает спазмы гладких мышц, обладает сосудорасширяющим действием и увеличивает сосудистую проницаемость. В главе 16 приводятся более полные сведения о ФАТ.

Интерлейкин-1 (ИЛ-1). Выше ИЛ-1 был описан как химический медиатор, продуцируемый нефагоцитирующими антигенпредставляющими клетками, который играет важную роль в индукции иммунного ответа. Однако ИЛ-1-подобная активность может продуцироваться многими другими типами клеток, в том числе эндотелиальными и фибробластными клетками, а также нейтрофилами. Существует несколько типов молекул ИЛ-1, которые обладают широким спектром действия на различные клетки. ИЛ-1 активирует синовиальные клетки и фибробласты, в результате чего происходят их пролиферация, секреция коллагена и выделение простаглицлинов. Хондроциты и остеокласты под действием ИЛ-1 секретируют коллагеназу, а в мышцах ИЛ-1 вызывает про-теолиз. ИЛ-1, возможно, идентичен эндогенному пирогену (см. главу 19) и отвечает за образование белков острой фазы воспаления в печени. Он является фактором хемотаксиса нейтрофилов и активирует их (см. главу 3). В настоящее время полагают, что ИЛ-1 имеет большое значение как медиатор хронического воспаления, особенно при ревматоидном артрите. Сведения об ИЛ-1 даны в главах 15 и 31.

Лимфокины. Лимфокины - это белковые медиаторы, выделяемые Т-лимфоцитами. В практических целях здесь рассматриваются лишь те из них, которые участвуют в эффекторной фазе клеточно-опосредованного иммунного ответа (см. рис. 4). Им приписы-

ваются наличие активности, что базируется на данных, полученных в исследованиях *in vitro*. Лимфокины являются факторами хемотаксиса нейтрофилов и макрофагов; они вызывают пролиферацию других лимфоцитов и расширение сосудов. Кроме того, они активируют макрофаги, повышая тем самым их способность уничтожать определенные микроорганизмы, например микобактерии туберкулеза, которые могут выживать в неактивированных макрофагах. Лимфокином, активирующим макрофаги, может быть γ -интерферон, который также предупреждает репликацию ряда РНК- и ДНК-вирусов. Некоторые лимфокины активируют остеокласты - клетки, резорбирующие кость. Более подробные сведения о лимфокинах даны в главах 7 и 14, а об интерферонах - в главе 29.

Гистамин. Гистамин выделяется стимулированными тучными клетками и базофилами. При взаимодействии гистамина с H_1 -рецепторами происходит расширение кровеносных сосудов и повышение их проницаемости, а также сокращение гладких мышц бронхоиол и кишечника. Через H_2 -рецепторы гистамин модулирует реакции бронхолярных гладких мышц и, возможно, функции лимфоцитов. В главе 9 описываются эффекты гистамина; там же даны критерии медиаторов.

Нежелательные эффекты воспалительных и иммунных реакций

Высокоэффективные и сложные реакции, описанные выше, в некоторых ситуациях могут быть неадекватно запущены факторами, которые сами по себе неопасны для организма. В других обстоятельствах, будучи запущенными адекватно, эти защитные механизмы могут работать избыточно. В обоих случаях это способно привести к повреждению тканей собственного организма. Неадекватная активация врожденных реакций проявляется в патогенезе ревматоидного артрита. Так, перекисные соединения из активированных нейтрофилов могут повреждать IgG. Измененный IgG действует как аутоантиген и вызывает дыхательный взрыв в нейтрофилах, который генерирует еще большее количество перекисей, способных повреждать ткани суставов, продолжая при этом нарушение IgG и т.д. Эта гипотеза патогенеза ревматоидного артрита объясняет прогрессирующее течение повреждений суставов на основе самоподдержива-

ющейся системы. Неадекватные иммунные реакции называют аллергическими или реакциями гиперсенситивности и разделяют их на четыре типа.

Тип I: немедленная (или анафилактическая) гиперсенситивность

Данный тип повышенной чувствительности наблюдается в том случае, когда неопасные сами по себе вещества, например пыльца растений, пчелиный яд, частицы домашней пыли, некоторые пищевые продукты или лекарства, вызывают образование IgE-антител с их фиксацией на тучных клетках. Последующий контакт с этими веществами приводит к выделению из тучных клеток гистамина и других медиаторов: лейкотриенов C_4 и D_4 , а также фактора активации тромбоцитов. При некоторых типах гиперсенситивности немедленного типа важную роль играют эозинофилы; возможно также участие других клеток: полиморфно-ядерных нейтрофилов и макрофагов. Эффекты повышенной чувствительности могут локализоваться на бронхиальном дереве (начальная стадия астмы), на слизистой оболочке носа (сенная лихорадка), на коже (крапивница), в желудочно-кишечном тракте. В результате генерализованной реакции возникает анафилактический шок.

Возможно, что реакции, наблюдаемые при гиперсенситивности немедленного типа, развились (в ходе эволюции) как составная часть защиты организма от проникновения гельминтов.

Тип II: антителозависимая цитотоксическая гиперсенситивность

Данный вид повышенной чувствительности наблюдается в том случае, когда антитела направлены против чужеродных для организма клеток. Например, при переливании несовместимой крови часть поверхности этих клеток является антигенами и вызывает образование антител. Другим примером служит повреждение сульфаниламидами поверхности белков полиморфно-ядерных лейкоцитов или белков тромбоцитов препаратом Sedormid. Последующая реакция антиген - антитело может привести к запуску системы комплемента или послужить основой для атаки клеток-убийц. Это приводит к гибели клеток-мише-

ней, что проявляется агранулоцитозом (в первом примере) или тромбоцитопенической пурпурой (во втором примере).

Тип III: гиперсенситивность, опосредованная иммунными комплексами

Подобный тип повышенной чувствительности наблюдается при реакции растворимого антигена с антителами. Сформировавшиеся комплексы могут активировать комплемент или (в некоторых случаях) прикрепляться к тучным клеткам, вызывая выделение медиаторов. Экспериментальным примером повышенной чувствительности III типа является реакция Артюса, при которой чужеродный белок вводят чрескожно кролику с высоким уровнем в крови антител к данному антигену. Через 3-8 ч область инъекции становится красной и отекает. При этом отмечается следующая последовательность событий: комплексы антиген-антитело образуются в небольших кровеносных сосудах; одновременно активируется система комплемента. Под влиянием C5a в зоне реакции скапливаются и стимулируются нейтрофилы. В стимулированных нейтрофилах образуются токсические метаболиты кислорода, секретируются лизосомные ферменты, а тучные клетки, активированные C3a, высвобождают медиаторы. Подобные события могут лежать в основе реакции на созревшее сено, которую называют «фермерское легкое», а также поздних астматических реакций, наблюдаемых через 7-8 ч после контакта с антигеном. Повреждения, обусловленные повышенной чувствительностью с иммунными комплексами, выявляются при некоторых формах гипертонии и болезнях почек. Сывороточная болезнь также представляет собой пример реакции III типа.

Тип IV: клеточно-опосредованная гиперсенситивность

Прототипом данной реакции является ответ на внутрикожную инъекцию белкового экстракта микобактерий у человека, сенсибилизированного к этому микроорганизму. Через 24 ч наблюдаются покраснение и уплотнение области введения, что связано с клеточной инфильтрацией кожи (преимущественно мононуклеарными клетками) в результате развития клеточно-опосредованного иммунного ответа. В качестве медиаторов реакции особую роль играют лимфокины. О них уже говорилось

выше; более подробное их описание дано в главе 14. Клеточно-опосредованная повышенная чувствительность лежит в основе реакции на укусы насекомыми (клещи, москиты), а также в основе высыпаний (например, при свинке и кори). Она также может принимать участие в повреждении тканей при ревматоидном артрите. Подобное иногда наблюдается при кожных реакциях на лекарственные препараты или химикаты, когда химическое вещество, соединяясь с белками кожи, образует чужеродный материал, который и вызывает клеточно-опосредованный иммунный ответ. Химические вещества, действующие по такому механизму, называют гаптенами.

Реакции повышенной чувствительности, как и защитные иммунные ответы, прямо или косвенно опосредуются лимфоцитами. Детальным исследованием функции и взаимодействия лимфоцитов занимаются иммунологи, однако некоторые аспекты функции лимфоцитов, которые представляют особый интерес для иммунофармакологии, рассматриваются в главе 7.

Исход воспалительной реакции

После упрощенного описания специфического иммунного ответа вернемся к рассмотрению первичного местного взаимодействия организма и патогена-к острой локальной воспалительной реакции. Совершенно ясно, что она может включать в себя врожденные реакции (т. е. иммунологически неспецифические сосудистые и клеточные события, описанные в начале данной главы) и большее или меньшее участие адаптивного ответа (т. е. специфического гуморального или клеточно-опосредованного иммунного ответа). Соотношение иммунологически специфических и неспецифических факторов зависит как от природы патогена, так и от участвующих во взаимодействии органов и тканей организма. Каким может быть исход такого взаимодействия? Если защитные механизмы разворачивают свое действие адекватно и эффективно, то возможно полное разрешение, и ткань, бывшая местом конфронтации, практически восстанавливается. Если в тканях имеются повреждения (гибель клеток, нагноение, изъязвление), необходимы репаративные процессы, которые могут привести к рубцеванию. При персистенции патогена процесс может перейти в хроническое воспаление-реакцию, которая длится месяцами или даже годами и сопровождается дест-

рукцией тканей, пролиферацией клеток и разрастанием соединительной ткани. В зонах такого поражения обнаруживаются преимущественно мононуклеары (лимфоциты и макрофаги) и атипичные клетки макрофагального происхождения. Возможно также существенное повышение активности фибробластов, что сопровождается разрастанием фиброзной ткани. Некоторые микроорганизмы, например возбудители сифилиса, туберкулеза и лепры, с самого начала инфекции вызывают реакции, характерные для хронического процесса. Причина некоторых серьезных воспалительных (хронических) заболеваний, таких как ревматоидный артрит, точно неизвестна, однако предположительно здесь имеет место неадекватное развитие иммунных реакций.

Упрощенное (вводное) описание взаимодействия организма и патогена будет далее расширено и конкретизировано, причем особое внимание будет уделено фармакологическому подходу. В первой части книги приводятся сведения о различных клетках, участвующих в таком взаимодействии. Во второй части описываются химические медиаторы; особое внимание уделяется критериям оценки различных веществ при их рассмотрении в качестве возможных медиаторов воспаления (см. главу 9). Часть 3 посвящена основным феноменам воспаления; в двух ее главах описываются местные изменения (сосудистые явления, формирование отека, накопление клеток); в двух других главах рассматриваются системные эффек-

ты взаимодействия организм - патоген: пирогенез (лихорадка), лейкоцитоз (повышение числа лейкоцитов в крови); в одной главе речь идет об участии нервных механизмов в воспалении применительно к астме.

В заключительной четвертой части книги даны рекомендации относительно выбора наиболее необходимых и адекватных фармакологических препаратов, влияющих на иммунные и воспалительные реакции. В эту часть включена глава об экспериментальных моделях, используемых для отбора лекарственных веществ, обладающих противовоспалительным эффектом. Некоторые характеристики влияния медиаторов и лекарственных препаратов на иммунный ответ приведены на рис. 3 и 4 настоящей главы.

Список литературы

Воспаление

Taussig M.J. (1979) *Process in Pathology: An Introduction for Students of Medicine*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Иммунология

McConnell I., Munro A. & Waldmann H. (1981) *The Immune System - A Course on Molecular and Cellular Basis of Immunity*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Roitt I. (1988) *Essential Immunology*, 6th ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Часть 1

Клетки, участвующие в
воспалении

Тучные клетки и базофильные лейкоциты

Дж. К. Формен (J. C. Foreman)

Тучные клетки были впервые описаны Эрли-хом, давшим им такое название (mastzellen-хорошо упитанные клетки) ввиду наличия в их цитоплазме большого количества гранул (рис. 6). Через несколько лет было установлено, что в гранулах таких клеток содержится большая часть гистамина организма. Независимо от этого была определена принадлежность гистамина к медиаторам острой аллергической или анафилактической реакции. Только в настоящее время выяснилось, что симптомы острой аллергии или анафилактического шока в значительной степени определяются выбросом гистамина и других фармакологически активных веществ из тканевых тучных клеток.

Гистамин играет важнейшую роль в воспалительном процессе (см. главу 9), однако его другие физиологические функции и участие в патологии пока неясны. Установлено, например, что выброс гистамина из тучных клеток под действием нейротрансмиттеров обе-

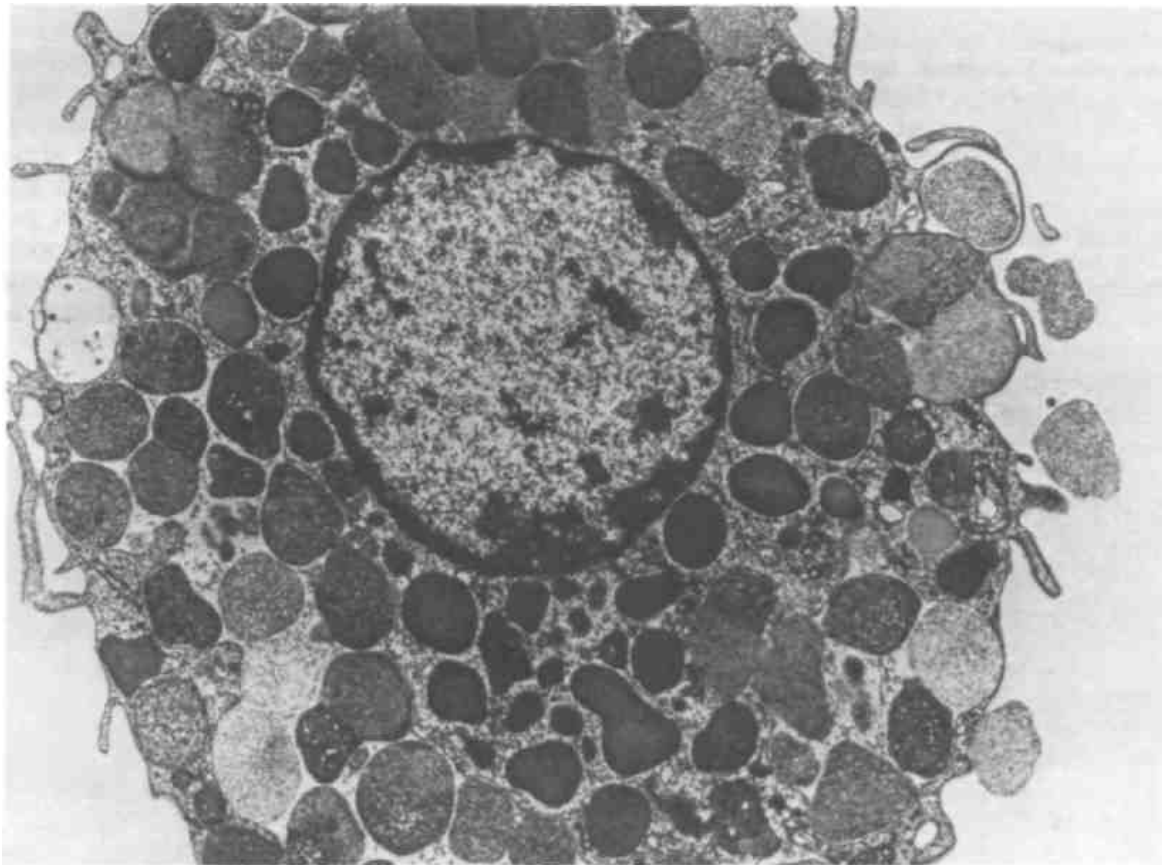


Рис. 6. Электронная микрофотография среза крысиной тучной клетки, стимулированной к выделению гистамина.

Следует отметить измененную электронную плотность секретирующих гранул по сравнению с несекретирующими. (Печатается с разрешения д-ра D. Lawson; Университетский колледж, Лондон.)

спечивает регуляцию микроциркуляции, особенно в коже. Однако, за исключением краткого рассмотрения неиммунологических стимулов для тучных клеток, данная глава посвящена прежде всего активации базофилов и тучных клеток комплексом антиген- IgE. Это взаимодействие является центральным событием при острых формах аллергий, таких как анафилактический шок, астма, аллергические риниты, крапивница и атопические дерматиты.

Происхождение тучных клеток и базофильных лейкоцитов

Тучные клетки и базофилы имеют ряд общих характеристик; вместе с тем между ними существуют и важные различия. Оба типа клеток обладают специфическими высокоаффинными рецепторами к иммуноглобулину E (IgE) и содержат гранулы с гистамином и протеогликаном. Тучные клетки и базофилы различаются по своей морфологии, имеют разные тинкториальные свойства, различаются по чувствительности к различным стимулам и фармакологическим препаратам. По морфологическим и биохимическим критериям тучные клетки представляют собой гетерогенную клеточную популяцию. Это впервые было обнаружено при фиксации и окрашивании тучных клеток слизистой оболочки кишечника и серозных оболочек брюшной полости крыс. Тучные клетки серозных оболочек (в отличие от клеток слизистой оболочки) под действием вещества 48/80 выделяют гистамин. Многие исследования тучных клеток и базофильных лейкоцитов направлены на изучение гетерогенности этих популяций, а также на выяснение их происхождения и созревания.

Доказательства гетерогенности тучных клеток получены при изучении мастоцитов слизистых и серозных (или соединительнотканых) оболочек. Тучные клетки слизистых оболочек окрашиваются алцианом голубым, но не сафранином, а в качестве основного протеогликана содержат хондроитин. Серозные и соединительнотканые тучные клетки окрашиваются как алцианом голубым, так и сафранином, а в качестве основного протеогликана содержат гепарин. Неудивительно поэтому, что тучные клетки различных тканей стали определяться как «слизистые» и «соединительнотканые». Теперь, однако, стало ясно, во-первых, что различие между ними не яв-

ляется столь уж простым и, во-вторых, что слизистые тучные клетки содержатся не только в слизистых оболочках. В настоящее время нет удовлетворительных методов классификации субпопуляций тучных клеток. Классификация, определяющая тучные клетки как «слизистые» и «соединительнотканые» и основанная главным образом на окрашивании и содержании протеогликана (именно он захватывает краситель), не учитывает ряда других характеристик клеток. Гранулы тучных клеток обладают протеазной активностью. Популяции тучных клеток крыс могут быть разделены по типу протеаз: RMCP I или II. Хотя существует корреляция между RMCP I и соединительноткаными мастоцитами, с одной стороны, и RMCP II и серозными тучными клетками с другой, это взаимоотношение несовершенно. Картина еще более усложняется, если клеточные популяции классифицируются на основании их ответов на стимулы и фармпрепараты. Например, «соединительнотканые» тучные клетки человеческой кожи (в отличие от тучных клеток легких) реагируют на вещество Р выделением гистамина.

Трудности классификации с использованием указанных выше критериев наводят на предположение о том, что тучные клетки в различных структурах организма не являются разными популяциями, а различие их свойств обусловлено влиянием микроокружения тканей на созревание предшественников тучных клеток. Если это предположение справедливо, то даже среди тучных клеток одной и той же локализации должны существовать различные типы в зависимости от степени их зрелости. Исследование происхождения и развития тучных клеток дает этому некоторое подтверждение.

В ранних исследованиях было показано, что развитие «слизистых» тучных клеток зависит от Т-лимфоцитов. Предполагалось, что Т-лимфоциты являются предшественниками тучных клеток, но в настоящее время эта гипотеза отвергнута. Многие данные о происхождении тучных клеток получены в эксперименте на мышах (линии W/W^v), генетически дефектных в отношении тучных клеток. Наиболее вероятно, что тучные клетки (а возможно, и базофилы) происходят из коммитированного предшественника тучных клеток гемопоэтической системы (в основном костный мозг). Для развития этой родоначальной клетки требуется ряд факторов: фактор роста тучных клеток, интерлейкин-3, Т-лимфоциты и по крайней ме-

ре еще одна вспомогательная клетка стромального происхождения.

Показано, что культивируемые клетки-предшественники в суспензии приобретают характеристики «слизистых» тучных клеток; если же их поместить в брюшную полость, они превращаются в «соединительнотканые» мастоциты. Предшественники тучных клеток, помещенные в строму слизистой оболочки, развиваются в «слизистые» мастоциты, а те же клетки, имплантируемые в кожу, превращаются в «соединительнотканые» тучные клетки. Совсем недавно было продемонстрировано превращение «слизистых» тучных клеток в «соединительнотканые» с изменением фенотипа. Точные условия для такого превращения пока не определены, однако одним из необходимых факторов может быть интерлейкин-3. Все эти данные (в совокупности) свидетельствуют об общем происхождении тучных клеток и базофилов из клетки гемопоэтической системы. Эта клетка развивается и созревает, причем изменения ее фенотипа определяются ее местонахождением. Вероятно, гетерогенность тучных клеток отражает степень зрелости этих клеток. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения этого предположения и ответа на следующие вопросы: а) чем определяется направление миграции предшественников тучных клеток; б) обладают ли клетки, находящиеся на разных стадиях созревания, разными биологическими функциями.

Продукция IgE-антител

Первичным событием в генерировании аллергической реакции является доставка антигена к специфическому рецептору эффекторной иммунной системы с последующим его распознаванием этим рецептором. Антиген взаимодействует с В-лимфоцитами (см. главу 7) или с их предшественниками и вызывает их дифференциацию в IgE-антителосекретирующие плазматические клетки и В-клетки памяти. Почему некоторые антигены у определенных индивидуумов вызывают образование специфических IgE, а не IgG, остается неясным. Антиген взаимодействует и с Т-лимфоцитами, что приводит к образованию супрессорных клеток, подавляющих продукцию IgE в стимулированных В-клетках. Другие Т-клетки взаимодействуют со стимулированными антигеном макрофагами (антигенпредставляющие клетки), в результате чего образуются Т-клетки-

помощники, которые усиливают В-клеточный ответ на антиген. Т-супрессоры могут быть специфическими по отношению к антигену. Кроме того, некоторые Т-клетки выделяют растворимые факторы, подавляющие образование IgE. Хотя IgE принадлежит к основному классу антител, опосредующих аллергические реакции, в полном ответе на аллерген участвуют и IgG.

Различия между IgE- и IgG-антителами показаны в табл. 1. Строение молекул антител обоих классов соответствует общей мономерной структуре иммуноглобулинов (см. главу 1). Более высокая молекулярная масса IgE в некоторой степени объясняется наличием дополнительного домена (C_H4) тяжелой цепи в Fc-области. Существуют экспериментальные данные, свидетельствующие об участии C_H4, C_H3 и C_H2 в связывании IgE с высокоаффинными рецепторами тучных клеток и базофилов.

Многие важные сведения об IgE получены благодаря исследованиям антител, продуцируемых злокачественными плазматическими клетками (миеломами), которые секретируют только IgE. В нормальной сыворотке содержится несколько десятков нанограмм IgE, и даже в сыворотке, полученной у аллергиков, выявляются его микрограммовые количества; так что миеломный IgE служит полезным источником белка для экспериментальной работы. Чистый миеломный IgE используется для приготовления Fc-, Fab'- и (Fab')-фрагментов при получении антител к IgE (анти-IgE, относящийся к классу IgG).

IgE, меченный ¹²⁵I, связывается почти исключительно с тучными клетками и базофилами через высокоаффинные рецепторы на их поверхности. Для конкурентного анализа связывания IgE были использованы различные его фрагменты. Анализ показал, что IgE связывается с рецептором посредством Fc-фрагмента. Как уже упоминалось выше, в связывании

Таблица 1. Сравнительная характеристика иммуноглобулинов G и E

Характеристика	IgG	IgE
Молекулярная масса	150000	200000
Содержание углеводов, %	3	13
Прогревание при 56 °С	Не влияет	Нарушает
Фиксация комплемента	+	+++
Аффинитет к Fc-рецепторам тучных клеток и базофилов	+/-	

участвуют C_{n2} , C_{n3} и C_{n4} домены Fc-фрагмента. Показано также низкоаффинное связывание IgE-рецептора с некоторыми подклассами IgG. Связывание IgE не ограничивается тучными клетками и базофилами, хотя только эти клетки несут IgE-рецепторы высокой аффинности. Низкоаффинные рецепторы к IgE обнаружены у макрофагов и некоторых популяций лимфоцитов.

IgE-рецепторы

В этом разделе обсуждение темы ограничивается высокоаффинным рецептором к IgE, выделенным из лейкозных базофильных клеток крыс или из крысиных перитонеальных тучных клеток. Получены данные, свидетельствующие о наличии низкоаффинных IgE-рецепторов на макрофагах и лимфоцитах.

Ауторадиографические и радиометрические определения связывания [125 I]IgE с нормальными тучными клетками и базофилами показали, что каждая клетка несет примерно 10^5 рецепторов. Базофилы лейкозной крысиной линии содержат их в 10 раз больше, т.е. 10^6 рецепторов на одну клетку. Данная линия является наиболее важным источником клеток для изучения Fc-ε- или IgE-рецепторов. Для получения рецепторов их метят 125 I и выделяют из лейкозных клеток методами аффинной хроматографии.

Современное представление о структуре рецептора дает рис. 7. Это гликопротеин, содержащий 13% углеводов. Молекулярная масса рецептора составляет примерно 87 000 (α -45 000, β -33 000, γ -9000); α -, β - и γ -субъединицы подразделяются на α_1 , α_2 , β_1 и β_2 ; обе γ -цепи идентичны. α -Субъединица расположена на поверхности клетки и связывает IgE. ρ - и γ -субъединицы, очевидно, встроены в мембрану, так как их невозможно пометить со стороны клеточной поверхности, ρ - и γ -субъединицы ассоциированы с α -субъединицей достаточно свободно, но они относятся к рецептору, поскольку синтез и деградация всех субъединиц клеткой строго координированы. Функции β - и γ -субъединиц в настоящее время неизвестны.

Сколько же молекул IgE связывает один рецептор? При инкубации со смесью IgE клеток, помеченных разными красителями, а именно: родамином, дающим красную флюоресценцию, и флюоресцеином, дающим зеленое свечение, на поверхности клеток выявляется диффузная зеленая и красная окраска. При обработке этих клеток анти-IgE-антителами на их поверхности происходит образование красных и зеленых агрегатов. Антиродаминовые антитела выявляют только красные агрегаты, а антифлюоресцеиновые-только зеленые. Таким образом, рецепторы, связывающие родамин-IgE, не агрегируют с рецепторами, несущими флюоресцеин-IgE, т.е.

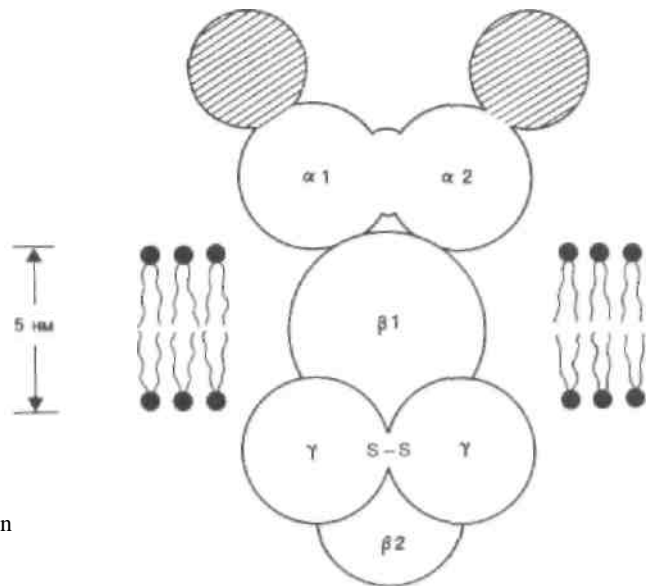


Рис. 7. Схема высокоаффинного рецептора к IgE.

Показано расположение субъединиц в мембране. Заштрихованные области обозначают углеводы [Metzger H., Kinet J.-P., Perez-Montfort R., Rivnay V., Wank S. A. Progress in Immunology, 1983, vol. 5, pp. 493-501-New York: Academic Press].

на один рецептор приходится один цвет, что свидетельствует об одновалентности IgE-рецептора.

В другой серии экспериментов определялось время восстановления флюоресценции после облучения лазером мембран тучных клеток, несущих флюоресцеин-IgE и родамин-IgE. Имобилизация флюоресцеин-IgE антителами предотвращала восстановление зеленой флюоресценции и не влияла на красную. Это исследование подтверждает положение об одновалентной природе связывания IgE-рецептор и отвергает любое взаимодействие типа рецептор-рецептор. Скорость восстановления флюоресценции в облученной зоне мембраны может быть использована для определения коэффициента диффузии рецептора в мембране. Он оказался равным $2 \cdot 10^{-7}$ см²/сн, что очень близко к значению коэффициента для липидного маркера в той же мембране $8 \cdot 10^{-9}$ см²/сн; это указывает на жидкую природу мембран тучных клеток при физиологической температуре.

Активация мембранного рецептора

Простое связывание молекулы IgE с Fc-ε-рецептором тучной клетки или базофильного лейкоцита не активирует клетку и не приводит к выделению гистамина или других активных веществ. Для активации необходимо присоединение специфического антигена к IgE, фиксированному на клетке.

Не активируют клетку и одновалентные антигены: выделение гистамина и других фармакологически активных веществ происходит только под действием бивалентных и много-

валентных антигенов. Ключом к пониманию стимуляции тучных клеток и базофилов, вероятно, является представление о поперечном сшивании двух соседних Fc-ε-рецепторов на мембране. Для доказательства этого могут быть применены разные методы, схематически представленные на рис. 8. Бивалентные или многовалентные антигены вызывают поперечное сшивание соседних IgE-молекул через их Fab-фрагменты (рис. 8, в), вызывая агрегацию Fc-рецепторов клеточных мембран. Анти-IgE, антитела класса IgG к Fc-ε-тяжелых цепей IgE, агрегируют рецепторы, как показано на рис. 8, г. Fc- и Fab'-фрагменты этого анти-IgE, будучи одновалентными, не активны. Лектин-конканавалин А активирует тучные клетки и базофилы, присоединяясь к IgE-связанным углеводам и сшивая соседние молекулы иммуноглобулина (см. рис. 8, д). Димеры IgE, полученные химическим путем, вызывают поперечное сшивание IgE-рецепторов. Очень изящно была показана возможность активации тучных клеток при агрегации Fc-рецепторов даже в отсутствие IgE. Это было достигнуто с помощью антител (IgG) к очищенным Fc-рецепторам. Действие этих антител схематически представлено на рис. 8, ж. Но если IgE занимает рецепторы (т.е. места, на которые направлено действие антирецепторных антител), тем самым маскируя их, то антирецепторные антитела не могут вызвать поперечное сшивание Fc-ε-рецепторов.

Модель поперечного сшивания рецепторов при активации тучных клеток и базофилов рождает ряд интересных вопросов. Во-первых, если мембрана жидкая и Fc-ε-рецепторы двигаются в ней свободно, то предусматривается (моделью) определенная частота рецепторных событий, которые могут быть соотнесены со

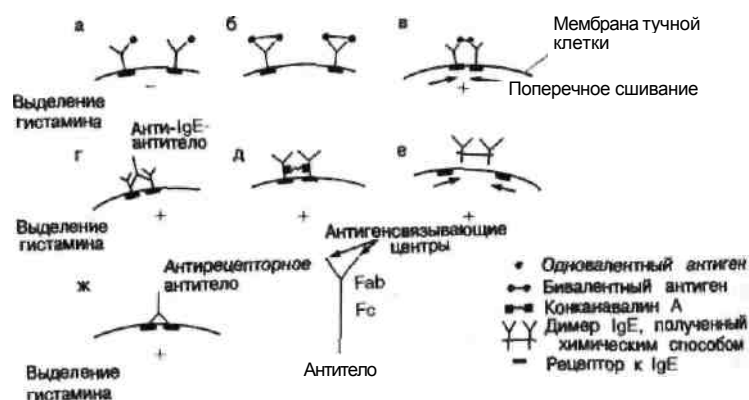
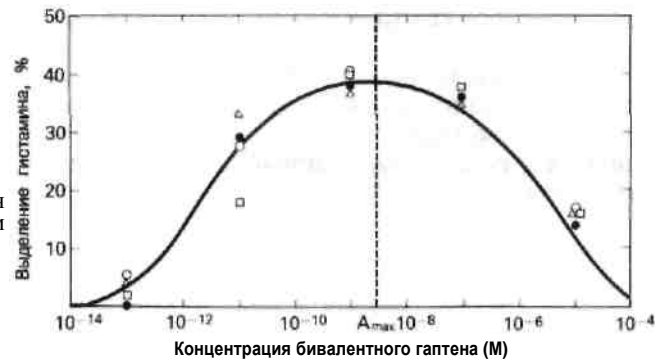


Рис. 8. Различные способы поперечного сшивания Fc_ε-рецепторов тучных клеток или базофилов.

Рис. 9. Зависимость «концентрация-эффект» для выделения гистамина базофилами под действием бивалентного бензилпенициллоилового гаптена (БПО₂). Базофилы несут IgE-антитела к БПО. Следует отметить что выделение гистамина после достижения максимума снижается при более высоких концентрациях гаптена [Dembo и соавт.-J. Immunol., 1978, 121, 354].



спонтанным выделением гистамина, что наблюдается как у тучных клеток, так и у базофилов. Во-вторых, какова связь между образованием поперечных связей и клеточной активацией, оцениваемой по секреции гистамина?

На рис. 9 показана кривая доза-ответ для гистамина, выделяемого базофилами при их стимуляции двухвалентным гаптенем бензилпенициллоилом (БПО)₂. Гаптен является двухвалентным, а базофилы несут IgE к гаптenu БПО. Так как на каждой молекуле IgE существует два места для распознавания антигена (см. главу 1), то антитело взаимодействует с двумя группами БПО. По мере повышения концентрации (БПО)₂ увеличивается количество поперечных связей между молекулами IgE, причем они имеют вид IgE-БПО-БПО • IgE. Увеличению количества поперечных связей соответствует усиление ответа клеток, но до определенного максимума, поскольку количество IgE, фиксированного клеткой, ограничено. Если повышение концентрации (БПО)₂ продолжается, то выделение гистамина снижается вследствие уменьшения количества поперечных связей при избытке (БПО)₂. Причина заключается в том, что вместо перекрестных связей типа IgE-БПО-БПО-IgE в условиях избытка (БПО)₂ образуются связи типа IgE-БПО-БПО, которые не вызывают секреции гистамина. Термодинамическая модель связывания IgE-(BnO)₂ может быть создана, что четко соответствует экспериментальным данным и свидетельствует в пользу концепции о пропорциональности секреции гистамина количеству образовавшихся поперечных сшивок. Минимальным сигналом к активации тучных клеток служит простое двухмерное связывание двух IgE-рецепторов (см. рис. 8).

Однако концепция о пропорциональности

секреции гистамина количеству поперечных сшивок согласуется не со всеми фактами; в ряде ситуаций картина представляется гораздо более сложной. Во-первых, базофилы некоторых людей неспособны выделять гистамин, несмотря на образование поперечных сшивок (см. ниже). Это может быть связано с отсутствием сопряжения Fc-рецепторов со вторичными посредниками (они будут описаны ниже), которые необходимы для переноса информации от поперечного сшивания к секреторным процессам. Во-вторых, количественные и качественные характеристики выделения гистамина различаются в зависимости от типа лиганда, вызывающего образование поперечных сшивок. Например, хотя димеры IgE, вызывающие образование поперечных сшивок только двух Fc-б-рецепторов, представляются достаточным сигналом к клеточной активации, тримеры и более высокие олигомеры иммуноглобулина служат более эффективным сигналом для тучных клеток и базофилов. Антигены и анти-IgE способны образовывать мультирецепторные агрегаты. В настоящее время связь между размером рецепторного агрегата и вызванным им ответом определена неточно, однако имеются указания на наличие влияния размера агрегата. У тучных клеток крыс время инактивации, вызванной поливалентным антигеном овалбумином, невелико ($t_{1/2} = 300$ с), а время полужизни инактивации после стимуляции димером IgE и анти-IgE составляет 1000 и 3500 с соответственно. Видимо, скорость инактивации определяется размером агрегатов IgE, образующихся при использовании конкретного лиганда. Более того, показаны различия в медикаментозном подавлении секреции гистамина, вызванной антигеном, и секреции гистамина, индуцированной анти-IgE.

Секреция гистамина

В этом разделе рассматриваются основные этапы активации тучных клеток и базофилов, которая происходит после поперечного сшивания Fc-ε-рецепторов и приводит к секреции гистамина.

Кальций

Секреция гистамина тучными клетками и базофилами после антигенной стимуляции зависит от наличия внеклеточного кальция. Оптимальная концентрация кальция — 1 мМ. Определенная секреция гистамина наблюдается в отсутствие внеклеточного кальция при стимуляции тучных клеток антигеном и не подавляется хелатами (веществами, связывающими кальций), такими как EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) или EGTA [ди-(2-аминоэтоксиг)этантетрауксусная кислота].

Зависимость от кальция антигениндуцированного выброса гистамина можно сравнить с участием кальция в сопряжении мембранного возбуждения с мышечным сокращением. Получен ряд данных, которые в своей совокупности свидетельствуют в пользу гипотезы о повышении уровня свободного кальция в цитозоле при агрегации Fc-ε-рецепторов; увеличение же концентрации кальция в тучных клетках приводит к возрастанию секреции гистамина.

Кальциевый ионофор A23187 может быть использован для переноса иона из внешней среды с высокой концентрацией кальция (1 мМ) внутрь клетки, где концентрация иона низка (0,1 мкМ); таким образом, его внутриклеточная концентрация повышается. В тучных клетках и базофилах A23187 вызывает кальций-зависимую секрецию гистамина. Сходные результаты получены при использовании другого ионофора, иономицина, что подтверждает роль вхождения кальция в тучные клетки и базофилы при индукции секреции гистамина. В клетках, стимулированных антигеном, ионофоры могут вызвать ограниченную секрецию гистамина и в отсутствие внеклеточного кальция. Это объясняется высвобождением кальция из внутренних депо тучных клеток и базофилов.

С помощью химических методов можно повысить проницаемость клеточных мембран для ионов и небольших молекул. После этого концентрацию внутриклеточного кальция можно контролировать извне кальциевыми буфер-

ными растворами. При использовании такого экспериментального подхода было показано, что секреция гистамина индуцируется возрастанием уровня внутриклеточного кальция с 0,1 мкМ до 1 мкМ.

Более прямые доказательства роли внутриклеточного кальция в активации тучных клеток были получены при введении кальция внутрь клеток через микропипетку. При этом отмечалась дегрануляция тучных клеток, но не определялась секреция гистамина. Слияние тучных клеток с липосомами или фосфолипидными комплексами, нагруженными кальцием, приводило к повышению уровня внутриклеточного кальция и секреции гистамина.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что искусственное повышение концентрации кальция в тучных клетках вызывает секрецию гистамина. Следующий вопрос таков: обусловлена ли секреция гистамина поперечным сшиванием Fc-ε-рецепторов, которое приводит к повышению внутриклеточного уровня кальция? Как уже отмечалось, для индуцированной антигеном секреции гистамина требуется внеклеточный кальций. Поперечное сшивание Fc-ε-рецепторов приводит к повышению проницаемости мембраны для кальция, который движется в клетку по градиенту концентрации. Известно, что редкоземельный элемент лантан блокирует кальциевые каналы мембраны. Лантан и другие редкоземельные элементы подавляют секрецию гистамина, причем это подавление отменяется при увеличении концентрации внеклеточного кальция. Вероятно, антигенная стимуляция обуславливает открытие кальциевых каналов мембран тучных клеток и базофилов, которые блокируются лантаном. Следовательно, поперечное сшивание Fc-ε-рецепторов открывает кальциевые каналы; поэтому существует возможность определения движения кальция внутрь клетки. Действительно, поток радиоактивного кальция [⁴⁵Ca] через мембраны тучных клеток при поперечном сшивании Fc-ε-рецепторов гораздо выше, чем в покоящихся клетках. Другими словами, агрегация рецепторов вызывает увеличение проницаемости мембран тучных клеток для кальция. Применение флуоресцентных индикаторов кальция, таких как quin и fura, позволяет определить временные и количественные изменения концентрации внутриклеточного свободного кальция [Ca²⁺]_i вследствие агрегации Fc-ε-рецепторов. Уровень [Ca²⁺]_i составляющий в покое 100 нМ, при агрегации рецеп-

торов возрастает до 1,2 мкМ; это увеличение зависит от внеклеточного кальция и блокируется лантаном. В экспериментах с индикаторами внутриклеточного кальция показано, что после стимуляции увеличение $[Ca^{2+}]_i$ обусловлено (отчасти) высвобождением иона из внутриклеточного депо, поскольку оно наблюдается и при отсутствии внеклеточного кальция.

Несмотря на все доказательства входа кальция в тучные клетки и базофилы, стимулированные поперечным сшиванием Fc-ε-рецепторов, электрофизиологические методы не обнаруживают наличия кальциевого канала, управляемого рецептором. При поперечном сшивании рецепторов выявляется деполяризация мембран, однако она не сопровождается секреторным ответом. Антагонисты кальция, в определенных концентрациях блокирующие потенциалзависимые кальциевые каналы, не подавляют секрецию гистамина. Однако несмотря на эти отрицательные данные, в пользу гипотезы свидетельствует обнаружение выделяемого из клеток RBL белка, который обладает свойствами кальциевого канала, управляемого Fc-8-рецептором. Этот белок, связывающий хромогликат, описан в главе 23. Таким образом, возникает парадокс, объяснить который можно двояко: либо мы пока неспособны определить кальциевые каналы, либо каналов нет, а существуют другие причины того, что изменения $[Ca^{2+}]_i$ после стимуляции зависят от внеклеточного кальция. Возможным объяснением может служить наличие кальциевого переносчика, управляемого рецептором.

В настоящее время неизвестно, каким образом кальций участвует в процессе секреции. Имеются данные о зависимости секреции гистамина от кальмодулина - белка, связывающего внутриклеточный кальций. Вероятно, кальций-кальмодулин активирует киназу (см. ниже) и другие ферменты, инициирующие секрецию.

Инактивация секреторного процесса

После обсуждения роли увеличения концентрации свободного внутриклеточного кальция в сопряжении процессов поперечного сшивания Fc-ε-рецепторов и секреции гистамина необходимо рассмотреть вопросы кальциевого гомеостаза. При обработке клеток кальциевыми ионофорами вход кальция становится неконтролируемым, и клетки гибнут. Под

♦♦

контролем кальция находятся многие метаболические процессы клетки, поэтому его уровень в большинстве клеток постоянно поддерживается. Ионофор A23187 совместно с кальцием вызывает 100% выделение гистамина из клеток. Такая величина секреции редко достигается при поперечном сшивании Fc-ε-рецепторов. Возможной причиной ограничения выделения гистамина в этом случае является наличие различных лимитирующих секрецию механизмов: нормализация мембранной проницаемости, секвестрация и удаление кальция, высвобождающегося в ходе секреторного процесса в клетках.

При стимуляции рецепторов тучных клеток и базофилов в бескальциевой среде выделяется небольшое количество гистамина. При добавлении кальция в разное время после рецепторного взаимодействия секреция быстро уменьшается при увеличении интервала времени между образованием перекрестных связей и добавлением кальция (рис. 10). Такая инактивация клеток, называемая десенситизацией, возникает в результате развития устойчивости клеток, стимулированных оптимальной концентрацией антигена в бескальциевой среде, ко второй антигенной стимуляции в среде, содержащей кальций. Однако эти клетки остаются чувствительными к ионофорам, что свидетельствует о связи рефрактерности, вызванной антигеном, с уменьшением мембранной проницаемости для кальция. Прямые измерения потока радиоактивного кальция $[^{45}Ca]$ показывают повышение проницаемости клеточных мембран тучных клеток после поперечного сшивания Fc-ε-рецепторов с последующим возвращением к исходному состоянию. Время снижения клеточной проницаемости на 50% составляет около 5 мин. Таким образом, тучные клетки и базофилы ограничивают свою секреторную активность только за счет временного повышения кальциевой проницаемости после перекрестного связывания рецепторов.

При исследовании инактивации тучных клеток, несущих IgE к двум различным антигенам, выявлено, что рефрактерность, возникающая после образования перекрестных связей рецепторов первым антигеном, не уменьшает ответа на второй. Инактивация специфична только для поперечно сшитых рецепторов. Однако это справедливо при поперечном сшивании лишь небольшой фракции Fc-ε-рецепторов. При агрегации большой фракции Fc-ε-рецепторов клетка становится нечувстви-

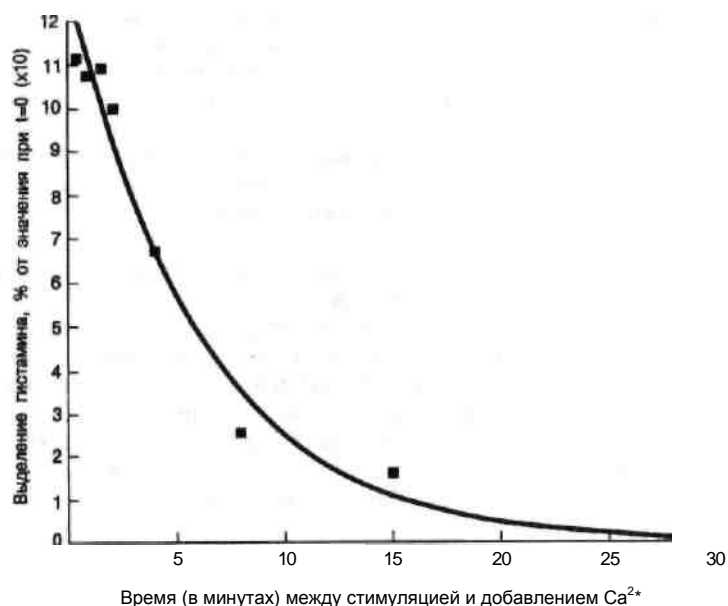


Рис. 10. Инактивация тучных клеток.

Клетки, стимулированные в нулевое время комплексом антиген-антитело, не способны выделять гистамин даже в присутствии внеклеточного кальция. Выделение гистамина уменьшается при увеличении интервала времени между стимуляцией и добавлением кальция. Вероятно, эта инактивация связана с закрытием кальциевых каналов.

тельной к эффектам связывания остальных рецепторов. Смысл неспецифической инактивации неясен, но предполагается, что количество мембранных кальциевых каналов, доступных для управления рецепторами, ограничено, причем число рецепторов превышает количество каналов. Таким образом, при поперечном сшивании большой фракции рецепторов, когда открыты и инактивированы все кальциевые каналы, агрегация оставшихся рецепторов неспособна вызвать ответ из-за отсутствия доступных каналов. Прямых доказательств этой гипотезы пока нет, и основанием для нее служит неконкретизированное предположение о необратимости инактивации кальциевых каналов или крайне низкой скорости восстановления инактивированных каналов.

В том же контексте следует рассмотреть и другое положение относительно кальция и клеточного ответа. Выше уже упоминалось о существовании определенной популяции лиц с базофилами, не выделяющими гистамин. Такие базофилы имеют обычный набор IgE-рецепторов, но даже полное сшивание этих рецепторов не приводит к секреции. Получены косвенные доказательства несопряженности IgE-рецепторов и кальциевых каналов. Таким образом, хотя увеличение концентрации свободных ионов кальция в тучных клетках и базофилах, видимо, вызывает секрецию, ответы на многие вопросы, касающиеся взаимосвязи Fc-ε-рецепторов и кальциевых каналов.

даны лишь частично или не даны совсем.

В этой связи следует также отметить существование клеточных механизмов, предназначенных не только для прерывания кальциевого сигнала, но и для ограничения секреции гистамина. Это предположение основывается на следующем наблюдении: кальциевый сигнал пропорционален количеству поперечно сшитых IgE-рецепторов, а секреторный ответ достигает своего максимума (обычно меньше объема полной секреции), когда перекрестно связана относительно небольшая часть рецепторов.

Метаболизм фосфолипидов

Обмен фосфатидилинозитола

В последние годы повышенное внимание уделяется мембранным фосфолипидам тучных клеток, а также возможной роли их изменений при сопряжении Fc-ε-рецепторов с секрецией гистамина. В настоящее время получены четкие доказательства того, что различные фосфолипидные метаболиты инозитола являются вторичными мессенджерами в процессе передачи сигнала. В первых исследованиях на тучных клетках, где проводилось измерение включений ³²P- или [³H]-инозитола в фосфатидилинозитол, фосфатидилхолин и др., было установлено, что стимуляция тучных клеток поперечным сшиванием Fc-ε-рецепторов при-

водит к распаду фосфатидинозитола. Кривые доза-эффект, а также временные характеристики процессов обмена фосфатидинозитола и стимулированной секреции гистамина тесно коррелируют.

Благодаря этим исследованиям наши знания о метаболизме фосфоинозида в клетках значительно расширились; схема метаболизма представлена на рис. 11. Фосфатидинозитол является мембранным фосфолипидом, который под действием АТФ-зависимой специфической киназы превращается в 4-монофосфат и 4,5-дифосфат (ФИФ₂). Стимуляция мембранного рецептора активирует фосфолипазу С, вероятно, через ГТФ-связывающий регуляторный белок. Фосфолипаза С превращает ФИФ₂ в инозитол-1,4,5-трифосфат (ИФ₃) и диацилглицерол. ИФ₃ быстро распадается, превращаясь в инозитол-1,4-дифосфат (ИФ₂). Как показывают недавно полученные данные, в некоторых системах ИФ₂ вызывает высвобождение кальция из внутриклеточных депо, а

диацилглицерол активирует фермент протеинкиназу С. Таким образом, инициированный стимуляцией рецепторов обмен фосфоинозида приводит к повышению уровня внутриклеточного кальция и активации протеинкиназы С. В ряде клеток наблюдается синергизм кальциевого сигнала и активности протеинкиназы С при осуществлении специфического ответа клетки.

Что же служит доказательством участия этих механизмов в передаче сигнала от поперечно сшитых Fc-ε-рецепторов к механизмам секреции гистамина? Недавние исследования, выполненные на клеточной линии крысиного базофильного лейкоцита (RBL), подтвердили ранее полученные данные о стимуляции обмена фосфатидинозитола при поперечном сшивании Fc-ε-рецепторов, а также о пропорциональности скорости гидролиза инозитолового фосфолипида количеству образовавшихся поперечных сшивок. Однако, помимо увеличения продукции ИФ₂ и ИФ₃, отмечается по-

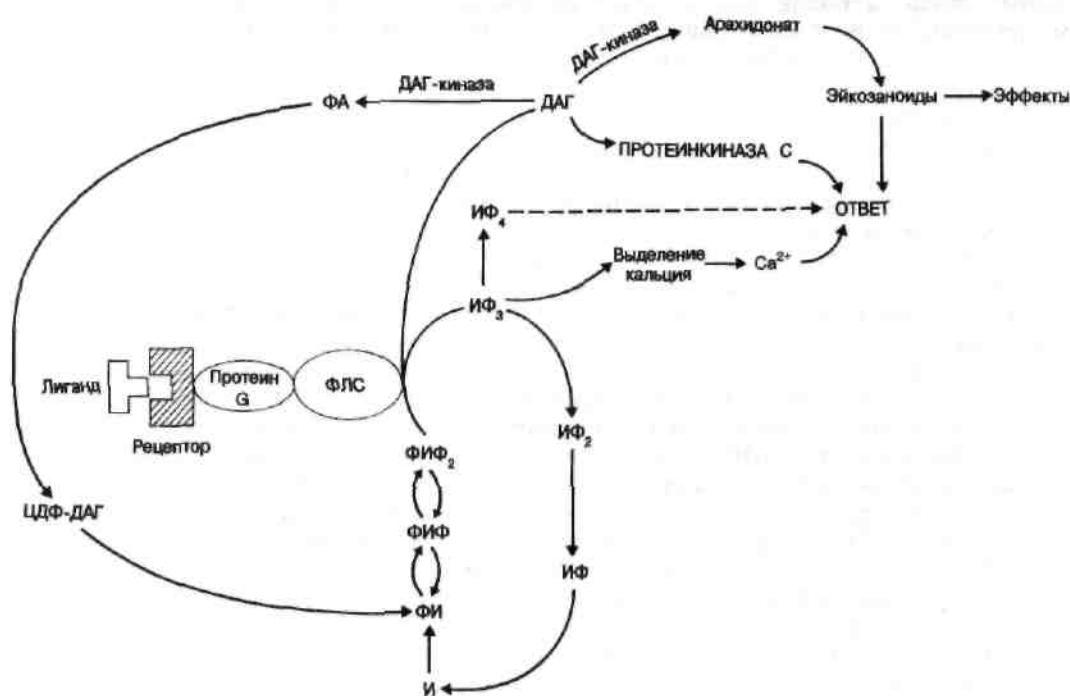


Рис. 11. Метаболизм фосфоинозида в клетках.

И-инозитол; ФА - фосфатидиловая кислота; ДАГ-диацилглицерол; ЦДФ-ДАГ-цитидиндифосфодиацилглицерол; ФЛС-фосфолипаза С; ФИФ₂ - фосфатидинозитол-4,5-дифосфат; ФИФ - фосфатидинозитол-4-фосфат; ФИ - фосфатидинозитол; ИФ₃- инозитол-1,4,5-трифосфат; ИФ₂-инозитол-1,4-дифосфат; ИФ-инозитол-1-фосфат и инозитол-1-фосфат; ИФ₄- инозитол-1,3,4,5-тетрафосфат.

вышенное образование других полифосфатов инозитола, включая ИФ₄, и пока неясно, какие из них участвуют (если это имеет место) в передаче сигнала. Другой проблемой является кальциевая зависимость фосфоинозитидного обмена. Как указывалось в ранних исследованиях, обмен фосфатидинозитола в тучных клетках, стимулированных поперечным сшиванием Fc-ε-рецепторов, не зависит от внеклеточного кальция. Этот момент весьма важен, ибо если фосфат инозитола предположительно генерирует кальциевый сигнал (высвобождение кальция ИФ₃ из внутриклеточных депо), то образование фосфата инозитола само по себе не должно зависеть от кальция. Однако недавние исследования на клетках RBL показали, что гидролиз фосфолипидов инозитола после стимуляции клеток в значительной степени зависит от кальция и лишь в определенных условиях является кальцийнезависимым процессом. Стало быть, теперь не вполне ясно, участвуют ли фосфаты инозитола в формировании кальциевого сигнала в тучных клетках и базофилах. Неясно также, какая форма фосфата инозитола является активной молекулой, если данный механизм действительно работает. Требуется своего объяснения и другой фактор-высокая степень зависимости секреции гистамина от внеклеточного кальция. Если, как отмечалось выше, источником увеличения [Ca²⁺]_i, активирующего клетки, служит внеклеточный кальций, то непонятно, каким образом фосфаты инозитола индуцируют вход внеклеточного кальция в клетку. В настоящее время единственно определенным действием ИФ₃, как сейчас полагают, является высвобождение внутриклеточного кальция.

Не более ясна и роль протеинкиназы C, фермента, активируемого диацилглицеролом-продуктом распада ФИФ₂. Диацилглицерол в качестве активатора протеинкиназы C может быть заменен форболовым эфиром 12-0-тетрадеканойлфорбол-13-ацетатом (ТФА). Сам по себе ТФА вызывает очень медленное выделение гистамина из тучных клеток и практически не влияет на гистаминовую секрецию RBL. Следовательно, только одна активация протеинкиназы C не является достаточным условием для запуска процесса секреции гистамина. Однако введение в клетку очень небольшого количества кальция (с ионофором A23187, не приводящим к секреции гистамина) совместно с активацией протеинкиназы C, индуцированной ТФА, приводит к синергизму

стимулов и достаточно выраженной секреции гистамина. Синергизм наблюдается также между ТФА (активация киназы C) и поперечным сшиванием Fc-ε-рецепторов, однако он имеет более сложный характер, поскольку он отмечается лишь при кратковременной экспозиции клеток с низкой концентрацией ТФА (3 нМ). При более длительной экспозиции клеток с 30 нМ ТФА сигнал, вызванный поперечным сшиванием рецепторов, подавляется. Это свидетельствует о том, что в подобных условиях ТФА подавляет кальциевый и, возможно, инозитолфосфатный сигналы. Возможна неоднозначная интерпретация результатов этих экспериментов: 1) протеинкиназа C способна как подавлять, так и стимулировать кальциевый сигнал; 2) ТФА может действовать посредством механизмов, отличных от активации киназы C.

Метилирование фосфолипидов

Помимо изменения обмена мембранного фосфатидинозитола при стимуляции в результате поперечного сшивания Fc-ε-рецепторов возможна инициация метилирования некоторых мембранных фосфатидов. Показано, что после образования поперечных сшивок между Fc-ε-рецепторами мембранный фосфатидилсерин декарбоксилируется, превращаясь в фосфатидилэтаноламин. Мембраны содержат два метилтрансферазных фермента, для которых одним из факторов является 8-аденозил-γ-метионин. Один из метилтрансфераз локализуется на внутренней поверхности мембранного бислоя, а вторая - на наружной. Первый фермент метилирует фосфатидилэтаноламин до фосфатидил-1'-монометилэтаноламина, являющегося субстратом для второй метилтрансферазы, которая во внешнем слое мембраны превращает его в фосфатидилхолин (рис. 12). Фосфатидилхолин может служить субстратом для фосфолипазы A₂, которая превращает его в лизофосфатидилхолин и арахидоновую кислоту. Реакции метилирования предшествуют секреции гистамина и по времени совпадают с входом кальция в тучные клетки. Кроме того, ингибиторы метилтрансфераз предупреждают секрецию гистамина и вход кальция в клетки, хотя кривые «доза-эффект» для этих ингибиторов не исключают возможности отсутствия связи между угнетением метилтрансферазной активности, с одной стороны, и подавлением секреции гистамина и движения кальция-с другой. Основная трудность здесь за-

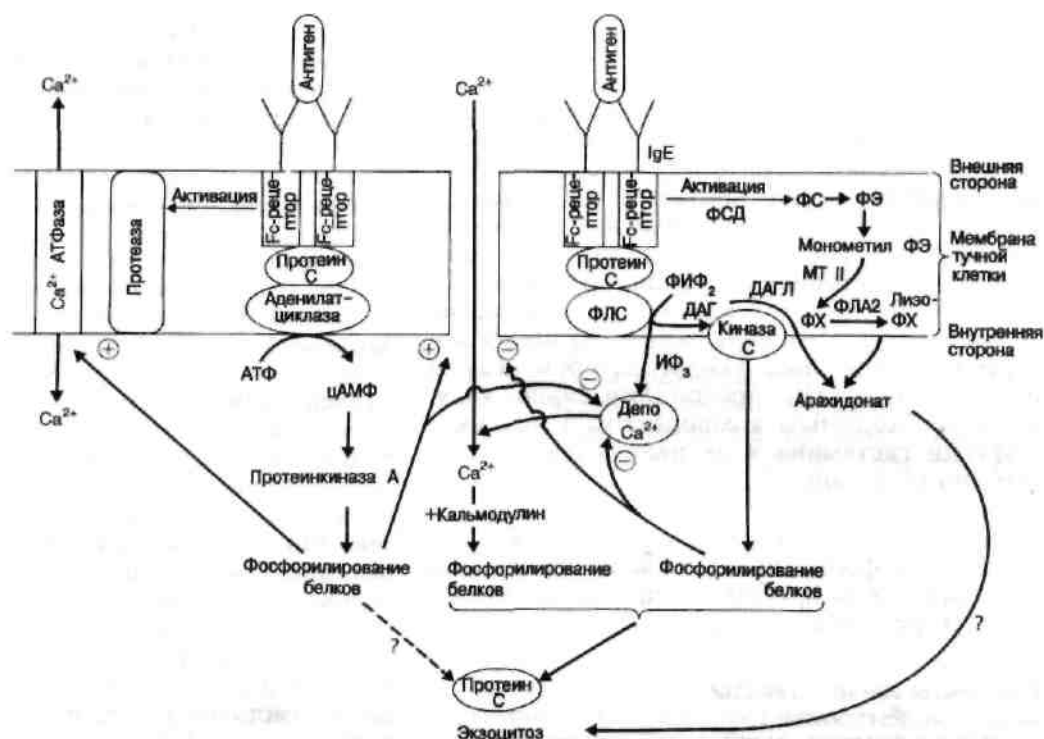


Рис. 12. Образование фосфатидилхолина.

ФЛА₂-фосфолипаза А₂; ФЛС-фосфолипаза С; ФС-фосфатидилсерин; ФЭ-фосфатидилэтаноламин; ФХ-фосфатидилхолин; МТ II-метилтрансфераза II; ДАГЛ - диацилглицерол-липаза; ФСД-фосфатидилсерии декарбоксилаза, — — торможение, + — активация. Для наглядности показана раздельная активация перекрестным связыванием Fc-рецептора протеина G, имеющего отношение как к ФЛС, так и к аденилатциклазе. Это разные белки, но, вероятно, они активируются одним и тем же перекрестным связыванием.

ключается в понимании того, каким образом данная система генерирует сигнал для клетки, поскольку все, казалось бы, свидетельствует в пользу образования фосфатидилхолина во внешней части мембраны и в то же время сам фосфолипид составляет значительную часть мембраны. Имеются указания на возможность увеличения подвижности мембраны, однако это не дает решения вопроса относительно механизма передачи сигнала.

ГТФ-связывающие белки

Как отмечалось выше, для превращения ФИФ₂ в ИФ₃ необходима активация фосфолипазы С, которая возможна при поперечном сшивании Fc-е-рецепторов через ГТФ-связывающий белок по механизму, аналогичному активации аденилатциклазы при связывании Р-агониста

с (3-адренорецептором. Показано, что коклюшный токсин, который тормозит активацию ферментов через ГТФ-связывающий белок, подавляет выделение гистамина из тучных клеток. Негидролизуемый аналог ГТФ, Gpp(NH)p, стимулирует выделение гистамина при его введении в проницаемые тучные клетки в присутствии кальция. Хотя ГТФ-регуляторный белок, участвующий в секрети гистамина, не был выделен, в пользу его существования свидетельствуют данные эксперимента на крысиных базофильных лейкоцитах. Свойства этого белка отличаются от свойств Ni и Ns ГТФ-регуляторных протеинов, участвующих в сопряжении тормозящих и стимулирующих рецепторов с аденилатциклазой в других системах. Недавно было показано, что белок G тучных клеток, участвующих в процессе экзоцитоза (см. ниже), отличается от белка G, активирующего фосфолипазу С.

Активация протеаз

Помимо кальциевого и фосфолипидного метаболизма, рассматриваемого в контексте передачи сигнала с рецептора на секреторный процесс, для полноты изложения необходимо сказать и об активации протеаз. Уже давно известно, что протеазы активируются при стимуляции тучных клеток. Кроме того, протеазы вызывают секрецию гистамина. Ингибиторы протеаз подавляют секрецию гистамина, но только в случае их присутствия во время поперечного сшивания Fc-ε-рецепторов. Таким образом, протеазы предположительно являются необходимым компонентом в процессе секреции гистамина и активируются при поперечном сшивании Fc-ε-рецепторов. Более того, протеазы могут участвовать в активации секреции гистамина (см. выше). Однако, как и в случае с фосфолипидным метилированием, непонятно, каким образом протеазы активируют секреторный процесс.

Продукты липоксигеназы

Кроме гистамина, тучные клетки, стимулированные комплексом антиген-IgE, продуцируют другие активные вещества, в том числе медленно действующее вещество анафилаксии (МДВ-А) и простагландины, особенно ПГD₂. В настоящее время МДВ-А идентифицировано как смесь двух или более метаболитов арахидоновой кислоты по липоксигеназному пути лейкотриенов D₄ и C₄ (см. главу 10). Таким образом, при активации мембранной фосфолипазы A₂ поперечным сшиванием Fc-ε-рецепторов может образовываться арахидоновая кислота, которая превращается в nrD₂ и лейкотриены. Эти метаболиты, как и гистамин, опосредуют некоторые эффекты воспаления, но в отличие от гистамина они не хранятся в клетке в готовом виде. Арахидоновая кислота может также образовываться при действии диацилглицероллипазы на диацилглицерол, продукт распада фосфатидилинозитола (см. рис. 12). Препараты, подавляющие липоксигеназу, такие как 5,8,11,14-эйкозатетраеновая кислота (ЭТЕК), угнетают и секрецию гистамина, поэтому, как полагают, продукты липоксигеназы могут не только выделяться (в качестве фармакологически активных веществ), но и участвовать в процессах, ведущих к секреции гистамина. Ингибиторы циклооксигеназы не влияют на секрецию гистамина, но тучные клетки и базофилы имеют рецепторы для

ПГЕ₂; взаимодействие последнего с этими рецепторами приводит к подавлению выделения гистамина, стимулированного комплексом антиген-IgE. Подавление секреции гистамина ПГЕ₂ обсуждается ниже.

Циклические нуклеотиды

Первоначальные наблюдения подавления адреналином антигенстимулированной секреции в легких были затем подтверждены на базальных лейкоцитах человека. В последующие годы идеи относительно роли циклических нуклеотидов в секреции гистамина развивались в разных направлениях. Подавление секреции гистамина в легких человека и морских свинок при активации р-адренорецепторов оказалось недостоверным. Для подавления секреции в базофилах требуются достаточно высокие концентрации изопреналина, а количественные характеристики, например pA₂, свидетельствуют об отсутствии на них Р-адренорецепторов. С другой стороны, хотя агонисты р-адренорецепторов не влияют на секрецию гистамина тучными клетками (у крыс), применение [³H]-дигидроалпренолола в радиолигандном связывании показало наличие на клетках р-адренорецепторов.

Кроме агонистов р-адренорецепторов, другие вещества, повышающие уровень циклического аденозин-3',5'-монофосфата, подавляют секрецию гистамина, вызванную поперечным сшиванием Fc-ε-рецепторов. Отмечена активность холерного эндотоксина, теofilлина, дибутирила цАМФ и аденозинфосфоротиоат. Теофиллин в высоких концентрациях (1 мМ) является ингибитором фосфодиэстеразы и, подавляя ферментативное разрушение цАМФ, вызывает повышение уровня внутриклеточного цАМФ. При более низких концентрациях (10 мкМ) теофиллин выступает как конкурентный антагонист аденозина и подавляет секрецию гистамина. В тучных клетках крыс и морских свинок аденозин потенцирует антигенстимулированное выделение гистамина. Механизм этого усиления неизвестен, однако следует отметить существенную разницу между тучными клетками и базофилами, поскольку в базофилах аденозин, напротив, подавляет секрецию гистамина. Было постулировано, что аденозин участвует в патогенезе аллергических реакций, потенцируя секрецию гистамина; однако в пользу этого положения представлены достаточно скудные доказательства.

При прямых измерениях уровня цАМФ в

условиях поперечного сшивания Fc-ε-рецепторов тучных клеток отмечается его быстрый подъем, предшествующий процессу выделения гистамина. По окончании секреции гистамина уровень цАМФ возвращается к исходным значениям. Интерпретация этих эффектов неопределенна, однако некоторые новые наблюдения позволяют сделать ряд однозначных выводов. Показано, что повышение уровня внутриклеточного цАМФ может сопровождаться не только подавлением секреции гистамина, но и ее увеличением в зависимости от типа стимулируемых клеток. Поперечное сшивание Fc-β-рецепторов приводит к такой секреции гистамина, при которой цАМФ повышает скорость секреции, но подавляет максимальную степень секреции. С другой стороны, при спонтанной и вызванной A23187 секреции гистамина цАМФ, по-видимому, лишь увеличивает скорость секреции. Кроме этих наблюдений, следует отметить выявление в тучных клетках крыс протеинкиназы, чувствительной к цАМФ, активация которой происходит при поперечном сшивании Fc-ε-рецепторов.

Таким образом, поперечное сшивание Fc-ε-рецепторов приводит к раннему повышению уровня цАМФ, который активирует протеинкиназу, участвующую в инициации секреции гистамина. Искусственный подъем уровня цАМФ также увеличивает скорость секреции. Кроме того, цАМФ обладает тормозящим эффектом по отношению к секреции (гистамина), вызванной поперечной сшивкой Fc-ε-рецепторов, что ограничивает максимальную степень секреции. Ингибиторное действие цАМФ может быть связано с ограничением подъема $[Ca^{2+}]_i$, вызванного стимуляцией, так как увеличение внутриклеточного цАМФ в тучных клетках может снизить повышенную проницаемость мембран для кальция или вход кальция вследствие поперечного сшивания Fc-ε-рецепторов. Предполагается, что уровни цАМФ в разных частях клетки могут реагировать на предъявление стимула по-разному, т.е. изменяться в противоположных направлениях и с разной скоростью.

В экспериментах было также исследовано действие агонистов α-адренорецепторов и холинорецепторов. В тучных клетках легких стимуляция α-адренорецепторов и холинорецепторов (мускариновых) усиливает секрецию гистамина, опосредованную Fc-рецепторами. Эти данные не были подтверждены при использовании крысиных тучных клеток и базофилов человека. Также отсутствуют количест-

венные данные о холино- и α-адренорецепторах на тучных клетках. В этом контексте следует также отметить сообщения об изменениях уровня цГМФ в тучных клетках при поперечном сшивании Fc-ε-рецепторов, хотя такие изменения не имеют сколь-нибудь существенного значения для контроля секреции гистамина.

АТФ и фосфорилирование белков

Выше были представлены ранние, связанные с мембраной этапы процесса секреции гистамина и обмена арахидоновой кислоты. О более поздних этапах известно относительно мало. Для секреции гистамина необходимо накопление внутриклеточного АТФ. При стимуляции тучных клеток поперечной сшивкой Fc-ε-рецепторов в присутствии глюкозы не происходит увеличения потребления кислорода и аноксия не полностью подавляет вызванную таким образом секрецию гистамина. Ингибиторы окислительного фосфорилирования, такие как цианид и антимицин А, лишь частично тормозят антигениндуцированную секрецию гистамина. Тучные клетки относительно бедны митохондриями, и окислительное фосфорилирование, по-видимому, не является абсолютным условием секреции гистамина.

Однако гликолиз в тучных клетках протекает активно, и удаление глюкозы вызывает частичное торможение секреции, опосредованной Fc-ε-рецепторами. Сочетание подавления окислительного фосфорилирования и удаления глюкозы полностью отменяет секрецию гистамина, а восстановление гликолиза либо окислительного метаболизма частично восстанавливает секрецию. Эти данные интерпретируются как зависимость Fc-ε-опосредованной секреции от АТФ, который может поставляться как в результате гликолиза, так и при окислительном фосфорилировании. Показано, что клетки, лишенные АТФ, неспособны секретировать гистамин, а стимуляция Fc-ε-рецепторов приводит к потреблению внутриклеточного АТФ. Уровень АТФ тучных клеток снижается при стимуляции секреции гистамина. Конечно, АТФ необходим для обеспечения многих клеточных процессов, а не только для секреции. Как уже отмечалось, имеются данные о вовлечении в секрецию гистамина ряда киназ, использующих АТФ (цАМФ-зависимая киназа, киназа С, фосфоинозитидкиназы), и вполне вероятно также, что АТФазы участвуют в механизмах транспорта кальция в клетку. Фосфорилирование белков, таким образом,

представляется необходимой частью секреторных механизмов.

При стимуляции крысиных перитонеальных тучных клеток анти-IgE или кальциевым ионофором A23187 фосфорилируются некоторые мембранные белки. Более постоянно фосфорилируются белки с молекулярной массой 78 000, 68 000, 59000 и 42000 дальтон. Известно, что фосфорилирование играет главную роль в регуляции клеточных функций, поэтому возникает следующий вопрос: какие процессы фосфорилирования белков участвуют в стимуляции или down-регуляции секреции гистамина.

После стимуляции крысиных перитонеальных тучных клеток анти-IgE дегрануляция клеток наблюдается через 1 мин, а фосфорилирование белков с молекулярной массой 68 000, 59000 и 49 000 дальтон завершается в течение 30-45 с. Белок с молекулярной массой 78 000 дальтон фосфорилируется отсроченно: процесс начинается через 10 с после стимуляции и завершается через 1 мин. Некоторое дефосфорилирование белков с молекулярной массой 68 000, 59 000 и 42 000 дальтон отмечается после пика фосфорилирования. Белок с молекулярной массой 42000 дефосфорилируется почти полностью.

Белки с молекулярной массой 68 000, 59 000 и 42000 фосфорилируются также при стимуляции тучных клеток ионофором A23187. В данном случае как секреция гистамина, так и фосфорилирование белков частично зависят от внеклеточного кальция. Белок с молекулярной массой 78000 не фосфорилируется при стимуляции клеток ионофором A23187, а его дефосфорилирование происходит независимо от наличия кальция во внеклеточной среде.

Приведенные данные свидетельствуют в пользу предположения об участии фосфорилирования белков с молекулярной массой 68000, 59000 и 42000 в процессе активации тучных клеток. Это следует из временных параметров процессов и кальциевой зависимости. Напротив, белок с молекулярной массой 78 000, вероятно, участвует в down-регуляции секреции, поскольку пик его фосфорилирования приходится на окончание секреции, фосфорилирование осуществляется независимо от кальция и не наблюдается при стимуляции тучных клеток ионофором A23187. Кроме того, следует отметить, что после активации поперечным сшиванием Fc-ε-рецепторов клетки становятся рефрактерными к стимулам (см. выше), однако при гистаминовой секреции,

вызванной ионофором A23187, процесс инактивации не наблюдается. Эти факты свидетельствуют в пользу участия белка с молекулярной массой 78000 в инактивационном процессе. Подобные предположения интересны также в свете данных, показывающих, что хромогликат вызывает фосфорилирование белка с молекулярной массой 78 000 дальтон (см. главу 23).

Экзоцитоз

Независимо от промежуточных реакций между мембранным сигналом и выбросом из гранул гистамина конечной стадией секреции гистамина является слияние мембран, окружающих гранулы, с мембранами клеток. Такое слияние предупреждает выделение содержимого цитоплазмы, сохраняет целостность клетки и способствует повторной дегрануляции. Этот процесс известен под названием экзоцитоз. После первоначального слияния мембран гранул с клеточной мембраной происходит слияние гранул между собой с образованием вакуолей, всегда имеющих сообщение с внешней средой. В точке слияния гранулярной и клеточной мембран белки оттеснены к противоположной части мембраны. Значение данного факта непонятно; возможно, целью этого процесса является сохранение мембранных белков. Совершенно очевидно, что по мере слияния гранул происходит увеличение поверхности клеточной мембраны. Показано, что тучные клетки регенерируют и заполняют новые гранулы, но возможно и слущивание избыточной мембраны в виде пузырей-полых структур, которые отпочковываются от клеточной поверхности.

Гранулы

Контакт гранул с внеклеточной жидкостью приводит к высвобождению гистамина и других активных веществ. Гранулы состоят главным образом из белкового матрикса, соединенного ионными связями с гистамином и протеогликаном. Ионы натрия внеклеточной жидкости вытесняют гистамин из матрикса. Протеогликаны варьируют в зависимости от вида и места локализации тучных клеток (см. выше); они определяют метахроматическое окрашивание тучных клеток толуидиновым синим. Белки матрикса обладают различными формами ферментативной активности, вклю-

чая (3-гексозаминидазную и Р-глюкуронидазную, и вместе с протеазами представляют типичные лизосомные ферменты (см. выше). Тучные клетки, по-видимому, проявляют определенную фагоцитарную способность *in vitro* и *in vivo*, захватывая коллоидное золото, вирусы и ядра сперматозоидов. Таким образом, помимо секреции гистамина тучные клетки с помощью гранул могут переваривать фагоцитируемый материал.

Тучные клетки и нейрогенное воспаление

Большинство исследований тучных клеток и базофилов было посвящено изучению их активации иммунными стимулами и их участия в аллергических реакциях. Но тучные клетки и базофилы реагируют и на ряд неиммунных стимулов, в том числе на основные пептиды и белки, нейтрофильный основной белок анафилатоксин (см. главу 12) и вещество Р. Так, медиаторы, связанные с нейтрофилами или с активацией системы комплемента, в свою очередь могут стимулировать выделение гистамина и других активных веществ из тучных клеток и базофилов. Выделение гистамина под действием нейропептидов (например, вещества Р) вызывает особый интерес, поскольку такие события служат основой для возникновения и распространения воспаления нервными механизмами. Например, расширение сосудов, которое наблюдается вокруг места травмы кожи, возможно, имеет нейрональную основу. В настоящее время показано, что чувствительные волокна, содержащие вещество Р, при

активации травмирующими стимулами выделяют вещество Р (основной ундекапептид), который в свою очередь способствует высвобождению гистамина. Выделившийся гистамин вызывает расширение сосудов и другие признаки воспаления.

Вещество 48/80, простой полиамин, в течение длительного времени использовался в качестве агента, вызывающего выделение гистамина из тучных клеток. Значение его влияния на тучные клетки неясно; однако, по некоторым данным, 48/80 вызывает выделение гистамина, действуя на рецептор вещества Р тучных клеток. Было бы интересно выяснить, какие еще основные пептиды, подобные анафилатоксинам, могут взаимодействовать с этим рецептором.

Список литературы

- Beaven M.A., Maeyama K., WbldeMussie E., AH H. & Cunha-Melo J.R. (1987) Mechanism of signal transduction in mast cells and basophils: studies with RBL-2H3 cells. *Agents Actions* 20, 137-145.
- Healicon R.M. & Foreman J. C (1984) Receptors for immunoglobulin E (IgE). In: Conn P. M. (ed) *The Receptors*, vol. 1, pp. 83- 140. Academic Press Inc, Orlando, USA.
- Metzger H., Alcaez G., Hohman R., Konet J.-P., Pribluda V. & Quarto R. (1986) The receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Ann. Rev. Immuno.* 4, 419-470.
- Nakano T., Kanakura Y., Nakahata T., Matsuda H. & Kita-mura Y (1987) Genetically mast cell-deficient W/W^v mice as a tool for studies of differentiation and function of mast cells. *Fedn. Proc.* 46, 1920-1923.
- Stevens R.L., Rothenberg M.E., Levi-Schaffer F. & Austen K.F. (1987) Ontogeny of *in vitro*-differentiated mouse mast cells. *Fedn. Proc.* 46, 1915-1919.
- Yee-Pang Yung & Moore M.A.S. (1985) Mast cell growth factor: its role in mast-cell differentiation, proliferation, and maturation. *Contemp. Top. Mol. Immunol.* 10, 147- 179.

3 Нейтрофильные лейкоциты

М.М. Дейл (M.M. Dale)

Нейтрофил является доминирующим типом белых клеток крови человека. Ядро такой клетки состоит из нескольких долей, а цитоплазма содержит гранулы. Нейтрофилы очень подвижны и первыми среди других клеток появляются в месте острого воспаления, представляя собой первую линию клеточной защиты от многих бактерий, которые они поглощают (фагоцитируют) и переваривают. Считается, что это их главная функция в организме; однако нейтрофилы обладают рядом других свойств *in vivo* и *in vitro*. Они являются секретирующими клетками, которые выделяют содержимое своих гранул в ответ на различные стимулы; они могут генерировать метаболиты O_2 , повреждающие ткани. Они способны вызывать внеклеточную гибель больших многоклеточных патогенов и клеток других тканей, покрытых специфическими антителами. При активации нейтрофилы могут участвовать в повышении проницаемости сосудов и увеличении отека; кроме того, они являются значительным источником хемотаксинов, таких как лейкотриен B_4 и ФАТ.

Структура

В окрашенном гистологическом препарате при световой микроскопии зрелый нейтрофил выглядит как клетка диаметром 12-15 мкм с ядром, состоящим из 2-5 долей, соединенных тонкими нитями ядерного материала. В них нет ядрышек и, следовательно, отсутствует синтез новых рибосом. Хроматин комковатый, а включения меченого тимидина в ДНК очень малы, что указывает на отсутствие репликации и невысокий уровень (или даже полное отсутствие) репарации/синтеза ДНК.

Цитоплазма содержит множество гранул (по крайней мере, двух разных типов) и очень мало органелл, характерных для других типов клеток. Эндоплазматический ретикулум скуден, количество полирибосом невелико. Могут определяться небольшие включения меченого уридина в РНК и низкий уровень синтеза

белка. Клетка содержит большое количество гликогена, являющегося главным источником энергии. Углеводный обмен в покоящейся клетке направлен по гликолитическому пути; в клетке, участвующей в активном фагоцитозе, во время «дыхательного взрыва» гексозомонофосфатный шунт потребляет до 30% метаболизированной глюкозы. Микротрубочки в клетке образуют каркас, распространяющийся и на клеточную мембрану, что имеет важное значение для осуществления ряда функций, таких как фагоцитоз, направленное движение и др.

На периферии клетки обнаруживается сеть тонких нитей актина, которые соединяются «актинсвязывающим белком». Эти нити вместе с миозином, АТФ, магнием и белком гельзолином составляют элементы системы движения. Миозин является АТФазой, активированной актином; в подвижных клетках (как и в гладких мышцах) он должен фосфорилироваться для взаимодействия с актином. Фосфорилирование осуществляется киназой легкой цепи миозина, которая регулируется Ca^{2+} и кальмодулином. Направление движения зависит от соотношения золея и геля на том или ином конкретном участке и контролируется локальным уровнем ионизированного кальция. Эти процессы важны для локомоции, фагоцитоза и секреции (подробное описание см. в главе 18).

Самым обычным компонентом цитоплазмы являются гранулы. Существуют видовые различия в их числе и составе. У человека выделяют два основных типа гранул: азурофильные и специфические. Однако есть данные о существовании третьего типа гранул, называемых секреторными пузырьками.

Азурофильные гранулы диаметром 0,5 мкм составляют примерно 30% общего количества гранул; их часто описывают как «типичные лизосомы». Состав гранул (табл. 2) представлен кислыми гидролазами, активными при низких значениях рН, которые определяются в лизосомах. В количественном отношении кислые гидролазы являются незначительным

Таблица 2. Состав гранул нейтрофилов человека

	Азурофильные гранулы	Специфические гранулы
Микробицидные элементы	Миелопероксидаза	Лизоцим
Нейтральные протеазы	Лизоцим Эластаза Катепсин G	Коллагеназа
Другие компоненты	Кислые гидролазы	Лактоферрин Белки, связывающие витамин В ₁₂

компонентом содержимого гранул. К главным компонентам относятся нейтральные протеазы и некоторые другие вещества с микробицидной активностью.

Важнейшей нейтральной протеазой является основной белок эластаза. В экспериментах *in vitro* показано, что этот фермент разрушает коллаген, эластин (протеогликан хрящей), фиброноген, фибрин и базальную мембрану. Эластаза действует на компоненты комплемента, превращая C5 в C5a, и может функционировать, как C3-конвертаза, выделяя C3b из C3 (см. главы 1 и 12). Показано, что данный фермент способен генерировать брадикининоподобный кинин, который увеличивает проницаемость сосудов (см. главу 13). Азурофиль-

ные гранулы также содержат коллагеназу и катепсин G. Катепсин G, будучи протеазой серина, обладает высокой основностью и профилем активности, сходным с эластазой. В нормальных условиях нейтральные протеазы, выделившиеся из клетки, подавляются сц-антитрипсином и сц-протеиназным ингибитором.

К микробицидным субстанциям азурофильных гранул относятся лизоцим и миелопероксидаза. Миелопероксидаза проявляет бактерицидную активность в присутствии перекиси водорода и хлорида. Лизоцим разрушает связи между мурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином, которые являются ключевыми молекулами полисахаридного каркаса клеточной стенки бактерий. (У некоторых бактерий лизоцим не способен проникать через липопротеиновый слой на внешней стороне клеточной стенки и поэтому не достигает своей мишени.)

По своим размерам специфические гранулы (диаметр 0,2 мкм) меньше азурофильных, но по количеству превосходят их в 2-3 раза. Они содержат лизоцим, коллагеназу, лактоферрин (белок, связывающий железо) и белок, связывающий витамин В₁₂. Лактоферрин участвует в контроле гранулопоэза по принципу отрицательной обратной связи. Специфические



Рис. 13. Сканирующая электронная микрофотография нейтрофила.

гранулы, как полагают, служат источником криптических рецепторов (см. ниже).

Гранулы третьего типа, или секреторные везикулы, содержат желатиназу и большое количество цитохрома b- обязательного компонента дыхательного взрыва (см. ниже).

При сканирующей электронной микроскопии нейтрофилы обнаруживают значительный избыток плазматической мембраны, образующей заметные складки на поверхности клеток (рис. 13). Большая часть такой мембраны может перемещаться внутрь во время фагоцитоза. Существует удивительно активный обмен мембран, обновление которых достигает 10% в час в покоящихся клетках и 30% - во время фагоцитоза. Фосфолипиды составляют 60-80% мембранных липидов. Основным источником нового материала фосфолипидов служат преформированные моноацильные предшественники, находящиеся в комплексе с альбумином плазмы. Фактором, ограничивающим синтез новой мембраны, является низкая способность нейтрофилов к синтезу белка. Некоторые компоненты мембраны, например рецепторы, подвергаются рециклингу (см. ниже).

Зрелые нейтрофилы, как и многие клетки, несут на своей поверхности отрицательный заряд, главным образом за счет остатков сиаловой кислоты. Уменьшение поверхностного заряда может иметь важное значение при адгезии нейтрофилов к другим поверхностям.

На мембране нейтрофилов найдены рецепторы для хемотаксинов $C5a(K_d = 5 \cdot 10^{-9} \text{ M})$, ЛТВ₄ ($K_d = 4 \cdot 10^{-10} \text{ M}$), ФАТ и формилпептидов бактерий, таких как ф. мет-лей-фен ($K_d = 1,3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$). Имеются также рецепторы для опсоинов-Fc-участок антител IgG ($K_d = 5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) и компонентов комплемента C3b/C3bi ($K_d = 3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$). При активации клеток хемотаксинами происходит перераспределение рецепторов. Так, количество рецепторов к C3b, которых в покоящейся клетке насчитывается 5000, возрастает более чем в 7 раз.

Функциональные свойства нейтрофилов

Нейтрофилы способны обеспечить необычайно обширный спектр ответов. Прежде всего мы рассмотрим некоторые формы активности, которые могут быть исследованы и определены количественно *in vitro*, а затем обсудим внутриклеточные механизмы передачи, которые участвуют в реакциях клеток.

Адгезия, хемокинез и хемотаксис

Адгезия к эндотелию венул является, вероятно, наиболее ранней реакцией нейтрофилов в зоне воспаления. Этот феномен вместе с хемотаксисом и хемокинезом детально обсуждается в главе 18.

Фагоцитоз

Фагоцитоз-это поглощение микроорганизмов, иммунных комплексов или других частиц. Микроорганизмы опсонизируются (делаются доступными для переваривания) посредством двух механизмов: с помощью специфического антитела (IgG), распознающего и связывающего организмы с Fab-фрагментом, и с помощью C3b-компонента комплемента, который обладает гидрофобным участком связывания. Установлено, что нейтрофилы располагают 120000 рецепторов для Fc-фрагмента IgG, а при активации-38000 C3b-рецепторов. Fc-рецепторы формируют кластеры. Некоторые частицы, например бусы латекса, прикрепляются и фагоцитируются без участия рецепторов.

После прикрепления частиц происходит их поглощение, в котором участвуют псевдоподии, охватывающие частицу таким образом, что она интернализируется в кармане, окруженном клеточной мембраной. Роль C3b-рецепторов заключается прежде всего в прикреплении микроорганизма или частицы к клеточной поверхности, а взаимодействие опсонизирующего IgG с Fc-рецептором служит основным сигналом к действительному поглощению. Однако в клетках, активирующихся хемотаксинами, C3b может опосредовать как прикрепление, так и поглощение. Как показывают исследования с макрофагами, другими фагоцитирующими клетками, для поглощения частиц большого размера (например, эритроцитов) опсоины должны покрывать всю поверхность частицы, а не какую-либо ее часть. Для поглощения также необходимо продолжительное последовательное взаимодействие опсоинов с рецепторами клеточной поверхности. Процесс можно сравнить с трехмерной застежкой-молнией, причем каждый «зубец» не пассивно занимает свое место, а активирует силовые элементы клетки. После поглощения гранулы сливаются с интернализованным карманом, или фагосомой, превращая ее в фаголизосому, в которую выделяются ферменты. Тафтсин, основной тетрапептид, происхо-

дающий из плазменного белка, способствует усилению фагоцитоза, возможно, посредством уменьшения электростатического отталкивания между частицей и клеткой.

Выделение содержимого гранул, или экзоцитоз

Экзоцитоз обычно определяют как «выделение лизосомных ферментов», хотя, строго говоря, гранулы не могут рассматриваться только как лизосомы.

Содержимое гранул может пассивно выделяться при повреждении клеток токсинами или при поглощении кристаллов. Активное выделение (секреция) может наблюдаться в ряде описанных ниже ситуаций.

Экзоцитоз при фагоцитозе

Известно, что различные ферменты, секвестрированные в покоящейся клетке, выделяются в процессе переваривания частиц совместно. Предположительно это обусловлено выделением содержимого гранул в фагоцитарную вакуоль прежде ее закрытия с внешней стороны (что сравнимо с рвотой во время еды).

Если поверхность хряща или какая-либо аналогичная поверхность покрыта иммунными комплексами или другими реактантами, стимулирующими фагоцитоз (агрегированные иммуноглобулины, производные комплемента и др.), то нейтрофилы могут к ней прикрепляться и выделять содержимое гранул; это называют «незавершенным фагоцитозом». В этом процессе участвуют те же рецепторы, что и при фагоцитозе, - Fc и C3b.

Регургитация, незавершенный фагоцитоз и пассивное выделение содержимого гранул могут лежать в основе определенных повреждений тканей при ревматоидном артрите, бронхите, респираторном дистресс-синдроме взрослых, некоторых типах васкулитов и нефритов. сц-Протеиназный ингибитор (а-пи), один из основных факторов, защищающих ткани организма от действия выделяющихся нейтральных протеаз, чувствителен к окислительной инактивации, а главным источником окислителей являются нейтрофилы.

Экзоцитоз, вызванный обработкой цитохалазином В

Нейтрофилы, обработанные цитохалазином В, в ответ на растворимые хемотаксины, такие

как C5a или формилпептиды (см. ниже), или же на частицы, стимулирующие фагоцитоз, выделяют наружу содержимое своих гранул. Цитохалазин В-это грибковый метаболит, который в концентрациях 10^{-6} - 10^{-5} М взаимодействует с двигательным аппаратом клетки, подавляя тем самым фагоцитоз и локомоцию. Подобно гельзолину, он растворяет гелевые комплексы актин-АСБ¹ за счет связывания с АСБ и усиливает актиновые нити (см. главу 18). Однако в отличие от гельзолина он оказывает общее действие на клетку, что приводит к дезорганизованным сокращениям вместо контролируемых местных эффектов. Содержимое гранул выбрасывается в местах инвагинации плазматической мембраны. Данный феномен является по существу артефактом *in vitro*, но он весьма полезен как средство изучения некоторых аспектов клеточной реакции на внешние стимулы. Так, обработка клеток цитохалазином В часто используется для изучения механизмов передачи сигналов при хемотаксисе. Однако следует учитывать, что получаемая при этом информация об экзоцитозе, особенно с азурофильными гранулами, может служить лишь общим ориентиром в отношении передачи сигнала при хемотаксисе. В таких экспериментах клетка статична и, скорее всего, принимает округлую форму благодаря равномерной концентрации хемотаксина. В организме же клетка движется по градиенту хемотаксина, а особия, вызванные взаимодействием хемотаксин-рецептор, почти всегда происходят в головном конце клетки.

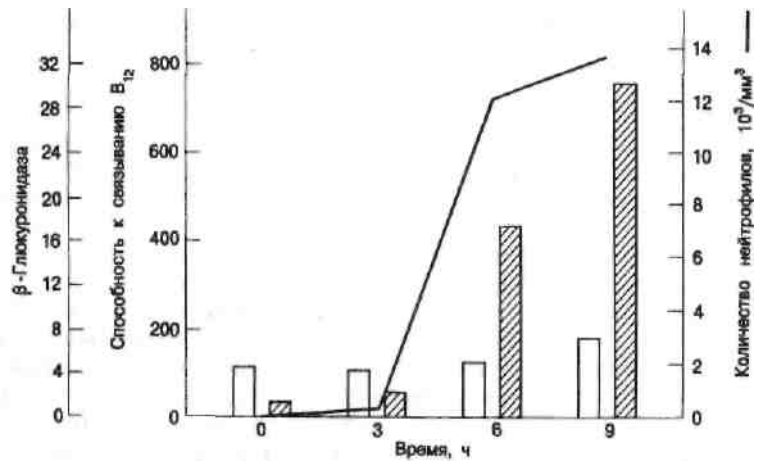
Экзоцитоз при использовании только растворимых стимуляторов

Некоторые вещества могут вызывать дегрануляцию нейтрофилов и в отсутствие цитохалазина В. Среди них можно отметить мирстилацетат (ФМА, коканцероген), конканавалин А (растительный лектин), ионофор кальция А23187 в низких концентрациях и интерлейкин-1. Особенностью этих веществ является способность вызывать относительно селективное выделение содержимого специфических (но не азурофильных!) гранул. Селективное выделение содержимого специфических гранул происходит и при хемотаксисе нейтрофилов через фильтр *in vitro*, и при их аккумуляции в кожных камерах и волдырях *in vivo* (рис. 14);

¹ АСБ-актинсвязывающий белок.

Рис. 14. Выделение содержимого специфических гранул при миграции нейтрофилов во время воспалительной реакции.

Показаны изменения белка, связывающего витамин В₁₂, и Р-глюкозидазы в экстрацеллюлярной жидкости кожной камеры через 3, 6 и 9 ч после образования волдыря. Единицы активности: для (3-глюкозидазы (заштрихованные столбики) - выделение 1 мкг фенолфталеина за 4 ч; для витамина В₁₂ (незаштрихованные столбики) - связывание 10 пкг/нмг [Wright, Gullin.-J. Immunol., 1979, 123, 285].



при этом количество поверхностных рецепторов активированных нейтрофилов возрастает (см. ниже).

Внеклеточная гибель

Нейтрофилы способны вызывать гибель клеток, покрытых антителами. Посредством своих Fc-рецепторов они прикрепляются к выступающим участкам Fc-антител. При стимуляции нейтрофилов форболовыми эфирами, фитогемагглютинином или конканавалином А наблюдается гибель окружающих клеток, в том числе и не покрытых антителами. При изучении этого процесса в качестве мишеней используются эритроциты цыплят или опухолевые клетки, меченные ⁵¹Сг (рис. 15), хотя в некоторых исследованиях описаны гибель шистосомул и повреждение грибковых гифов *in vitro* под действием нейтрофилов. Точный механизм внеклеточной гибели, вызванной

нейтрофилами, неизвестен, хотя здесь предполагается участие нейтральных протеаз и(или) микробицидных механизмов.

Дыхательный взрыв

Стимуляция нейтрофилов вызывает резкое (иногда более чем 50-кратное) увеличение потребления кислорода. Механизм этого процесса не вполне ясен, однако известно, что в нем принимает участие образование высокореактивного нестабильного промежуточного продукта (супероксида), а также перекиси водорода. Ферментом, необходимым для инициации дыхательного взрыва, предположительно является оксидаза плазматической мембраны, которая в качестве донора электронов использует НАДФН по следующей схеме:

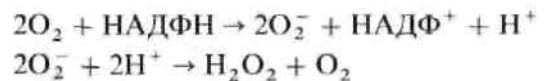
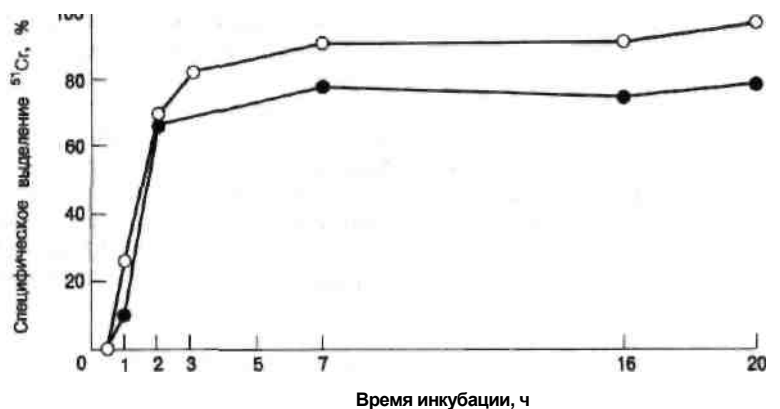


Рис. 15. Выделение ⁵¹Сг из опухолевых клеток печени морских свинок (кривая с темными кружками) и мышей (кривая со светлыми кружками) при мечении специфическими антителами в присутствии нейтрофилов в качестве эффекторных клеток.

Отношение эффекторные клетки - клетки-мишени составляет 50:1. Процент специфического выделения ⁵¹Сг = (выделение ⁵¹Сг в присутствии нейтрофилов и антисыворотки минус спонтанное выделение) + (выделение ⁵¹Сг под действием 5% Triton X-100 минус спонтанное выделение) [Hopkins, Dale-Immunology, 1980, 40, 513].



В то же время глюкоза метаболизируется через гексозомонофосфатный шунт; при этом регенерируется НАДФН, который используется O_2 -образующим ферментом и глутатион-зависимой системой, обезвреживающей H_2O_2 . В течение дыхательного взрыва клетка секретирует протоны.

Основным стимулом дыхательного взрыва обычно служит фагоцитоз, однако в условиях эксперимента он не является обязательным атрибутом. К эффекторным стимуляторам дыхательного взрыва относятся форболмирицилацетат, аналоги диацилглицерола (например, 1-олеоил-2-ацетилглицерол), кальциевые ионофоры, растворимые хемотаксины и другие мембранные лиганды. Для стимуляции необходимы высокие концентрации этих веществ, за исключением форболовых эфиров, а некоторые стимуляторы (например, растворимые хемотаксины) требуют совместного их применения с цитохалазином В. Следует признать, однако, что нефагоцитарные стимулы являются артефактами *in vitro* и не дают точного представления о ситуации *in vivo*. Увеличение потребления кислорода необходимо также при процессах внеклеточной гибели.

Хемоллюминесценция вследствие выхода протонов, которая сопровождает дыхательный взрыв, может использоваться для регистрации этого типа клеточной реакции.

Образующиеся супероксиды и перекись водорода, а затем (что более важно) и гипохлорид (возникающий при катализируемом миелопероксидазой окислении Cl^- перекисью водорода), гидроксильные радикалы и синглетный кислород являются основными веществами, используемыми нейтрофилами для уничтожения микроорганизмов. Важным микробцидным механизмом предположительно является и ощелачивание фаголизосом.

Перечисленные метаболиты кислорода участвуют и в повреждении тканей при различных патологических состояниях, например при нарушениях иммунных комплексов. Как было показано, повреждение молекул IgG супероксидом, образованным активированными нейтрофилами, приводит к агрегации IgG. Эти агрегаты могут сами стимулировать дальнейшее образование перекисей и в то же время способны действовать как аутоантигены. Таким образом, неадекватная активация нейтрофилов (при дыхательном взрыве) послужит основой для самоподдерживающегося повреждения тканей, наблюдаемого при ревматоидном артрите (см. главу 31).

Компоненты реакции стимулированных нейтрофилов

Адгезия, хемотаксис и хемотаксис, фагоцитоз, высвобождение содержимого гранул, дыхательный взрыв и метаболическая активность, сопровождающая эти эффекты, могут быть вызваны одинаковыми стимулами в различных условиях. Характеризуя реакции нейтрофилов, особенно на описанные стимулы, которые аналогичны наблюдаемым *in vivo*, необходимо выяснить, каким образом запускаются эти реакции, участвуют ли в них стереоспецифические рецепторы и какие события следуют за взаимодействием лиганд-рецептор. Для ответа на эти вопросы ниже приводятся результаты исследований реакций нейтрофилов на группу синтетических пептидов и рассматриваются механизмы передачи сигналов в клетке.

Взаимосвязь структура - активность синтетических ф. мет-пептидов, стимулирующих нейтрофилы. Специфические рецепторы ф. мет-пептидов

В 1975 г. было установлено, что некоторые простые формилированные пептиды в очень низких концентрациях обладают свойствами нейтрофильных хемотаксинов (см. главу 18). Данное исследование основывалось на следующем предположении: поскольку бактериальные продукты являются хемотаксинами, то и пептиды, сходные с бактериальными, также могут быть хемотаксинами. (Бактерии начинают синтез белка с формилметионина; у человека этого не наблюдается.) Впоследствии было обнаружено, что эти пептиды в определенных условиях, помимо хемотаксиса, могут стимулировать другие реакции нейтрофилов. Были исследованы различные ди-, три- и тетрапептиды (формилированные и неформилированные), причем для каждой формы их активности вычисляли ED_{50} ¹. Сравнительная активность некоторых из этих пептидов как факторов хемотаксиса и экзоцитоза показана в табл. 3, где за единицу активности принята активность формилметионинлейцина (ф. мет-лей). Самым активным пептидом оказался ф. мет-лей-фен (ФМЛФ), у которого ED_{50} при стимуляции экзоцитоза кроличьих нейтрофилов, обработанных цитохалазином В, соста-

¹ ED_{50} -концентрация препарата, которая необходима для получения 50% максимального эффекта.

Таблица 3. Относительная стимулирующая нейтрофильная активность синтетических пептидов

Пептиды	Относительная активность	
	хемотаксическое действие	высвобождение содержимого азурофильных гранул
Ф. мет	0,0003	0,0001
Ф. мет-лей	1	0,82 0,28
Ф. мет-фен	1,3	4470
Ф. мет-мет	0,57	0,23 41,9
Ф. мет-лей-фен	5050	1380 3,6
Ф. мет-лей-глу	0,37	1,3 0,17
Ф. мет-мет-мет-мет	760	0,29
Ф. мет-мет-фен	1900	
Ф. лей-три-мет	17	
Мет-лей-фен	0,48	
Мет-мет-мет-мет	0,19	
Мет-мет-фен	0,7	

вила $7 \cdot 10^{-11}$ М. В других исследованиях показано, что ф.норлей-лей-фен обладает почти такой же активностью, что и ф.мет-лей-фен. В природе норлейцин не встречается, но по своей структуре он близок к метионину и может замещать его в белковом синтезе бактерий.

Очень специфическая зависимость структура-активность для реакции на пептиды предполагает их взаимодействие со специфическими рецепторами на плазматической мембране нейтрофилов; в пользу этого свидетельствует способность биологически неактивных пептидов конкурировать с активными пептидами в ряде биологических систем. К таким пептидам-антагонистам относятся карбобензоксифен-мет (КБ-фен-мет) и 5-бутоксикарбонил-фен-лей-фен-лей-фен (БК-фен-лей-фен-лей-фен). Хотя построение графика Шилда и вычисление значений pA_2 не производились, было показано, что КБ-фен-мет, использованный в одной концентрации, вызывает параллельный сдвиг кривой доза-эффект для выделения лизоцима и для хемотаксиса, причем без уменьшения максимального ответа.

При определении связывания с нейтрофилами человека ф.норлей-лей-фен-норлей- $[^{125}I]$ тир-лиз, ED_{50} которых для хемотаксиса составляет $4 \cdot 10^{-11}$ М, было получено быстрое и обратимое насыщаемое связывание при 24°C с константой равновесной диссоциации $1,3 \cdot 10^{-9}$ М, а количество мест связывания достигало 120000. Сходные значения получены на нейтрофилах кролика при использовании ф.норлей-лей-фен. Следует отметить, что ED_{50} для хемотаксиса составила $7 \cdot 10^{-11}$ М, поэто-

му для возникновения данной реакции необходимо связывание пептидов лишь с небольшой частью рецепторов-явление, часто наблюдаемое при взаимодействии препарат - рецептор на других типах клеток. Оптимальное связывание отмечается при рН 6,75. Относительная активность пяти пептидов при конкурентном вытеснении меченого лиганда из мест связывания коррелирует с их относительной активностью как хемотаксисов. IC_{50}^1 для ингибирования связывания составила $4,5 \cdot 10^{-5}$ М, а для ингибирования хемотаксиса-приблизительно 10^{-5} М.

В одном из исследований показано, что при взаимодействии нейтрофилов с пептидами происходит расщепление пептидов на составляющие их аминокислоты. Ингибиторы протеаз или избыток субстрата тормозят этот процесс, на основании чего можно предполагать существование пептидазы, связанной с рецептором. Не исключено, однако, что большинство пептидных лигандов интернализируются перед деградацией (см. ниже).

Совершенно очевидно, что на поверхности нейтрофилов имеются рецепторы для небольших ф.мет-пептидов, а в недавних исследованиях было показано, что данные пептиды являются природными хемотаксинами, продуцируемыми бактериями. Проводимые в настоящее время исследования направлены на выделение и структурное определение этих рецепторов.

Механизмы передачи сигнала

Роль полифосфоинозитидов

В клетках многих типов частью процесса сопряжения «сигнал-активация» является описанный Nishizuka (1984) и Berridge, Irvine (1984) распад полифосфоинозитидов. После стимуляции рецептора происходит гидролиз очень небольшого компонента клеточной мембраны-фосфатидилинозитолдифосфата (ФИФ₂)-при участии кальцийнезависимой фосфолипазы С. В результате гидролиза образуются два внутриклеточных посредника: инозитолтрифосфат (ИФА мобилизующий внутриклеточный кальций, и диацилглицерол (ДАГ), активирующий протеинкиназу С. Подобные процессы протекают и в нейтрофилах, что было

¹ IC_{50} -концентрация ингибитора, которая необходима для 50% уменьшения максимального ответа.

Рис. 16. Влияние 10^{-7} М ф.мет-лей-фен на распад 4,5-дифосфата фосфатидинозитола.

Клетки предварительно метили ^{32}P . Результаты выражены в процентах изменения меченого фосфолипида. Показаны отсутствие (светлые кружки) и присутствие (темные кружки) кальция во внешней среде [Dougherty и соавт.- Biochem J., 1984, 222, 307].

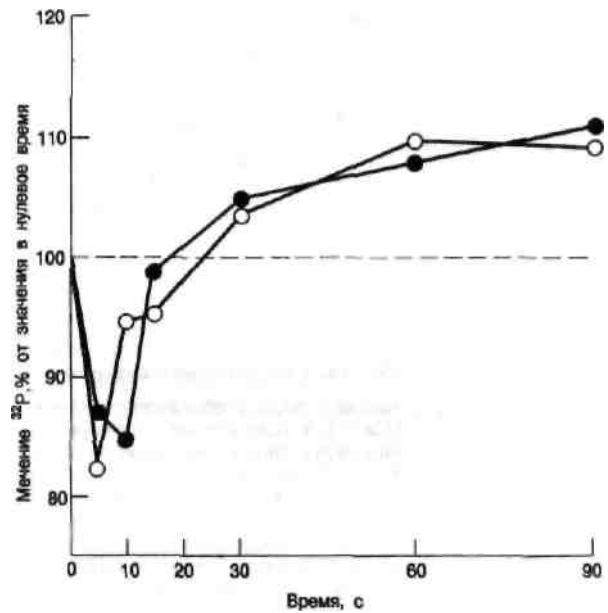
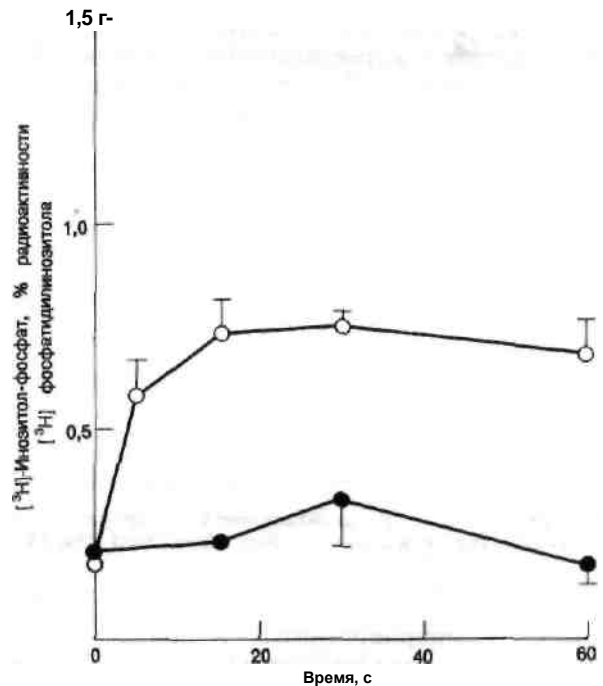


Рис. 17. Влияние 10^{-7} М ф.мет-лей-фен на образование инозитол-трифосфата в клетках, предварительно меченных ^3H -инозитолом. Результаты представлены в процентах от радиоактивности, связанной с фосфатидинозитолом, которая составила примерно 70 000 cpm/mg белка. Кривая с темными кружками-контрольные клетки; кривая со светлыми кружками-клетки, стимулированные в нулевое время ф.мет-лей-фен. По Dougherty и соавт., 1984.)



показано достаточно четко. При стимуляции нейтрофилов ФМЛФ происходит распад ФИФ₂, даже в отсутствие внеклеточного кальция (рис. 16), и образуются ИФ₃ и ДАГ (рис. 17).

Роль кальция

Кальций-важная внутриклеточная передаточная молекула для таких реакций нейтрофилов, как хемотаксис и дегрануляция. При движении

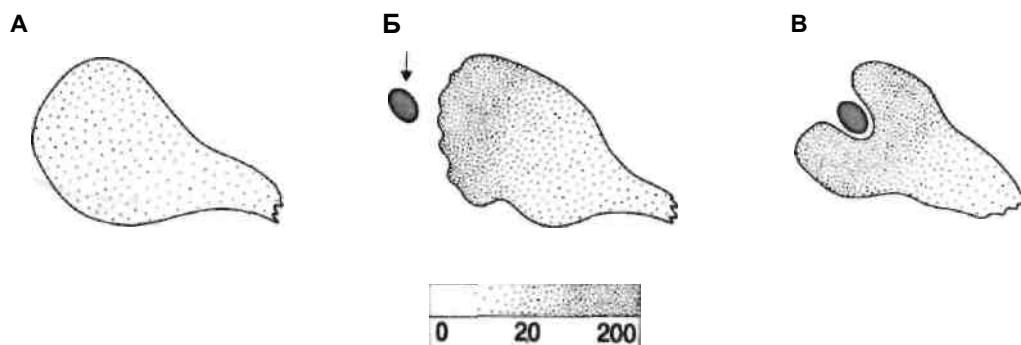


Рис. 18. Распределение кальция в покое и активированных клетках.

Числа в полосе обозначают наномолярные концентрации $[Ca^{2+}]_i$. А-нестимулированная клетка. $[Ca^{2+}]_i$ в теле клетки составляет 74 нМ, в ламеллоподии- 69 нМ ($n = 17$). Б-нейтрофил, мигрирующий к опсонизированной частице зимозана (стрелка). $[Ca^{2+}]_i$ в теле клетки- 108 нМ, в ламеллоподии- 146 нМ ($n = 12$). В-нейтрофил, фагоцитирующий опсонизированную частицу зимозана. $[Ca^{2+}]_i$ в теле клетки- 106 нМ, в псевдоподийной области- 161 нМ ($n = 31$). Ламеллоподии определен как передняя треть клетки, тело-как ее средняя треть, а область псевдоподия-как часть (клетки), окружающая опсонизированную частицу. (Адаптированный рис. 1 из работы Slawier и соавт. Science, 1985, 230, 663, где измерение Ca^{2+} определено по кальцийзависимой флюоресценции клеток, меченных Quin-2.)

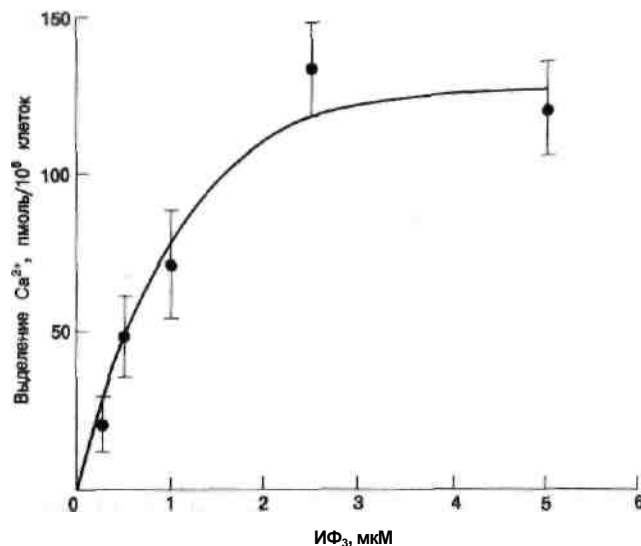


Рис. 19. Влияние ИФ₃ на выделение Ca^{2+} проницаемыми клетками [Prentki и соавт., J. Biol. Chem., 1984, 259, 1377].

клетки к микроорганизму и при его последующем фагоцитозе отмечается весьма четко локализованное повышение концентрации цитозольного кальция в переднем конце клетки (рис. 18). Такое повышение происходит двумя путями. Первоначальная фаза роста обеспечивается мобилизацией внутриклеточного кальция, выходящего из немитохондриального депо под действием ИФ₃, образующегося из ФИФ₂ (см. выше и рис. 19). ИФ₃ синтезируется

непосредственно перед началом процесса и тесно коррелирует с клеточной реакцией (см. рис. 17). Однако в отсутствие внеклеточного кальция реакция не определяется, что свидетельствует о необходимости повышения клеточной проницаемости для кальция при деградации. Увеличение кальциевой проницаемости происходит после образования ИФ₃. Окончательная мобилизация внутреннего кальция также определяется ИФ₃. Показано, что на-

чальные подъем цитозольного кальция определяется кальциевым каналом плазматической мембраны. В этом процессе принимают участие инозитолтетрафосфат (ИФ₄), производное ИФ₃. Местное увеличение цитозольного кальция обычно необходимо для активации «двигателя». Повышение концентрации кальция активирует гельзолин-актинфрагментирующий белок, вызывающий местные изменения соотношения геля и золя. Необходимо также участие в этом процессе кальмодулина, который активирует киназу легкой цепи миозина, фосфорилирующую миозин. Миозин взаимодействует с F-сетью актина, образуя главный силовой элемент клетки (см. главу 18). К другим эффектам кальция в клетке относятся активация фосфолипазы А₂ (см. ниже) и, возможно, активация кальцийзависимой фосфолипазы С, гидролизующей фосфатидилинозитол и монофосфат фосфатидилинозитола с образованием ДАГ (но не ИФ₃).

Увеличение концентрации кальция в цитозоле служит необходимым и достаточным стимулом для экзоцитоза и, возможно, для хемотаксиса и фагоцитоза (хотя частицы, опсонизированные С3b_i, могут фагоцитироваться независимо от изменений [Ca²⁺]), но не для дыхательного взрыва, для которого главным передаточным механизмом является активация протеинкиназы С.

Роль протеинкиназы С

Протеинкиназа С- это фермент, активируемый кальцием. Он обычно присутствует в цитозоле, но при активации клетки связывается с мембранными фосфолипидами, например с фосфатидилсеринном. ДАГ повышает аффинитет протеинкиназы С к кальцию, поэтому он становится активным уже при нормальной концентрации кальция в клетке. Экспериментально показано, что даже при поразительно низких концентрациях внутриклеточного кальция активация протеинкиназы С (ПКС) служит мощным стимулом для дыхательного взрыва.

ПКС фосфорилирует цитохром В₂₄₅ один из самых компонентов НАДФН-оксидазы. Следует, однако, отметить, что в большинстве экспериментов, показавших влияние ПКС на дыхательный взрыв, применялись неприродные соединения, например ФМА. ФМА, относящийся к соединениям с высокой жирорастворимостью, очень медленно метаболизируется в клетке; результаты, полученные при использовании ФМА, могут никак не соотноситься с данными

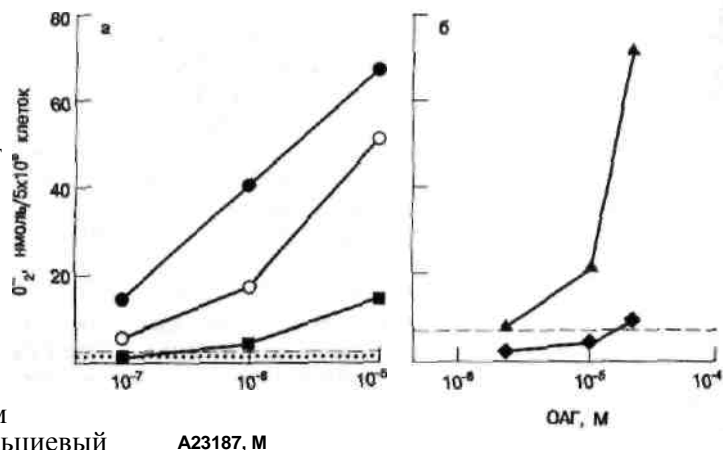
in vivo, так как естественный активатор протеинкиназы С (ДАГ) очень быстро метаболизируется в клетке и, следовательно, доступен лишь при низких концентрациях, локально и только после стимуляции рецепторов. При хемотаксисе, вызванном растворимыми хемотаксинами, ДАГ синтезируется при распаде ФИФ₂ и может присутствовать в клетке лишь непродолжительное время. Для дыхательного взрыва, стимулом для которого in vivo является фагоцитоз, необходимо более длительное присутствие ДАГ, поэтому в последующем может иметь место гидролиз фосфатидилинозитола с участием кальцийзависимой фосфолипазы С.

Nishizuka (1984) предположил, что синергизм между кальцием и протеинкиназой С должен иметь большое значение для клеточных реакций. Такой синергизм показан у ней-трофилов при использовании синтетического диацилглицерола (1-олеоил-2-ацетоглицерол, ОАГ) для стимуляции протеинкиназы С и *нонофора двухвалентных ионов А23187 с целью* повышения концентрации кальция в цитозоле. ОАГ быстро метаболизируется в клетке теми же ферментами, что и ДАГ, поэтому он считается более физиологичным стимулятором. Подпороговые концентрации ОАГ действуют синергично с А23187, вызывая дозозависимый сдвиг влево кривой «концентрация - эффект» для А23187 в отношении образования О₂, а также выраженное увеличение максимального ответа (рис. 20, а). Аналогично этому, низкая концентрация А23187 усиливает эффект ОАГ (рис. 20, б).

Протеинкиназа С оказывает комплексное влияние на передачу сигнала. Как и в других клетках, этот фермент является разнонаправленным регулятором некоторых процессов. Так, если активаторы протеинкиназы С синергичны с рецепторными стимуляторами дыхательного взрыва, то они же подавляют рецепторную стимуляцию дегрануляции (рис. 21), вызванную ф.мет-лей-фен и ЛТВ₄, а также стимуляцию хемотаксиса под действием С5а. Подавление сопровождается снижением содержания кальция в цитозоле (рис. 22) и, вероятно, происходит на уровне рецептора или ассоциированного с ним белка G, поскольку А23187 и подобные ему агенты, вызывающие повышение [Ca²⁺]: в обход рецепторов, проявляют синергизм с ФМА в отношении экзоцитоза. Подавление, по-видимому, затрагивает лишь рецепторы к растворимым хемотаксинам, но не СЗБ- и Fс-рецепторы, участ-

Рис. 20. Синергизм активации протеинкиназы С (ОАГ) и увеличения $[Ca^{2+}]_i$ (A23187) при образовании перекиси водорода.

а- A23187 (квадраты), A23187 с $1,1 \times 10^{-5}$ М ОАГ (светлые кружки) и A23187 с $2,3 \times 10^{-5}$ М ОАГ (темные кружки); точечная линия - результаты, полученные при низкой концентрации ОАГ, пунктирная линия - при высокой концентрации ОАГ; б- ОАГ (ромбы) и ОАГ с 10^{-6} М A23187 (треугольники); пунктирная линия - результаты действия с 10^{-6} М A23187 [Penfield, Dale-Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, 125, 332].



вующие в фагоцитозе и дыхательном взрыве. ПКС также активирует кальциевый насос, выкачивающий Ca^{2+} из клетки, что способствует уменьшению цитозольного кальция и может замедлить обмен ФИФ₂.

Следующим эффектом ПКС является активация системы сопряженного обмена Na^+/H^+ , т.е. выведения наружу протонов и введения внутрь Na^+ , что приводит к оселачиванию цитозоля (см. ниже). Точное значение активации ПКС при стимуляции нейтрофилов до сих пор неизвестно, и, хотя показано фосфорилирование ряда белков (31, 3К, 40К, 50К, 55К, 64К, 70К и 90К), их природа и функция еще не совсем ясны. Возможно, что белок 31, 3К является цитохромом В₂₄₅ компонентом НАДФН-оксидазы. Протеин 40К может быть

липокортином, поэтому фосфорилирование этого пептидного медиатора действия глюкокортикоидов может «выключать» липокортин и способствовать его активации при повышении уровня кальция в цитоплазме, которое сопровождается активацию ПКС.

Поскольку ПКС обладает как положительной передающей, так и негативной модулирующей функциями, эффекты ингибиторов ПКС трудно поддаются интерпретации. Некоторые из них, например H_7N_9 и С1, более активны в отношении цАМФ-зависимой киназы, которая сама по себе обладает отрицательным модулирующим действием на нейтрофилы, и менее активны в отношении ПКС. В качестве активатора ПКС обычно используется ФМА; об отрицательных свойствах

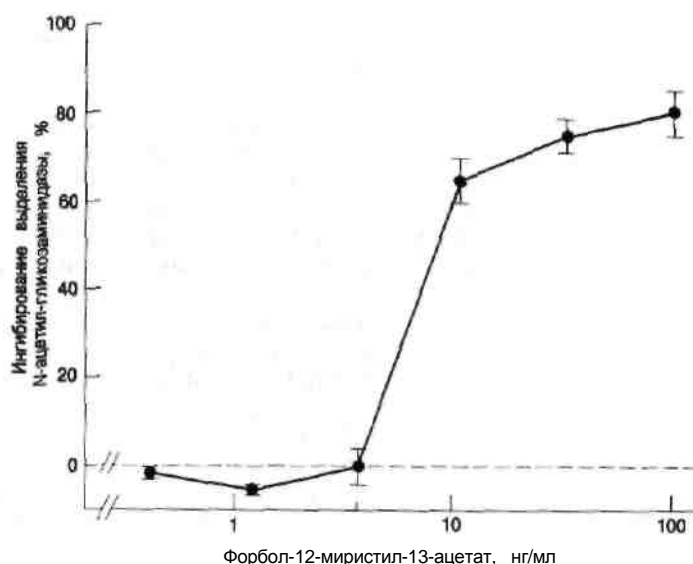


Рис. 21. Ингибиторное действие предварительной инкубации (3 мин) нейтрофилов кролика с ФМА на экзоцитоз, индуцированный 2×10^{-9} М ф. мет-лей-фен [Nassache и соавт.-J. Biol. Chem., 1985, 260, 2125].

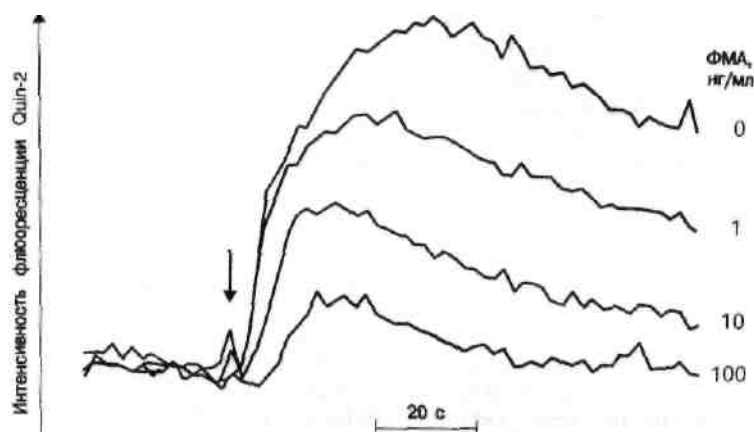


Рис. 22. Влияние предварительной инкубации (3 мин) при различных концентрациях ФМА на индуцированную ф.мет-лей-фен флюоресценцию кроличьих нейтрофилов, нагруженных Qlip-2. Стрелкой показано добавление 2×10^{-9} М ф.мет-лей-фен [Naccache и соавт.-J. Biol. Chem, 1985, 260, 2125].

ФМА как биологического зонда уже упоминалось выше. В качестве более специфичных ингибиторов ПКС, по крайней мере при изучении дыхательного взрыва, предложены сфингоидные основания.

Гуаниннуклеотид-регуляторный белок

В передаче сигнала в нейтрофилах, как правило, участвует стимулирующий гуаниннуклеотид-регуляторный белок (ГНРБ). Преинкубация нейтрофилов с коклюшным токсином (который в других типах клеток дает АДФ-рибозилирование таких белков, устраняя их активность) приводит к ослаблению реакции нейтрофилов на ф.мет-лей-фен, но не влияет на пострецепторные механизмы активации (ФМА для протеинкиназы С и A23187 для кальция). В нейтрофилах ГНРБ (называемый Ср или Nr) активирует не аденилатциклазу, а фосфолипазу С. Это было показано при использовании аналогов ГТФ, которые активируют нейтрофилы и вызывают распад полифосфоинозитидов в мембранах нейтрофилов. ГНРБ уменьшает зависимость от Ca^{2+} фосфолипазы С, которая необходима для гидролиза **ФИФ₂**, так что фермент осуществляет свою функцию при нормальной концентрации внутриклеточного кальция. Дополнительный внутриклеточный ГНРБ принимает участие в экзоцитозе азурофильных гранул.

Уже давно фториды известны как особенно сильные стимуляторы дыхательного взрыва. (Влияние фторидов на экзоцитоз трудно определить, поскольку они могут использоваться лишь при крайне низких концентрациях внеклеточного Ca^{2+} .) Предполагают, что фториды стимулируют ГНРБ, активирующий фосфолипазу С.

Транспорт натрия и изменения внутриклеточного рН

Ф.мет-пептиды активируют амилоридчувствительную систему сопряженного транспорта Na^+/H^+ , которая обеспечивает вход Na и выход H^+ , что приводит к повышению внутриклеточного рН с 7,2 до 7,8. Этот эффект, вероятно, связан с активацией ПКС (см. выше). Изменение рН модулирует образование O_2 (которое при подавлении ощелачивания снижается на 55-75%) и, по имеющимся данным, может регулировать активность нейтрофилов, например хемотаксис. Ф.мет-лей-фен не вызывает какого-либо определяемого повышения проводимости Na^+ .

Фосфолипиды и метаболизм арахидоната

Ряд данных свидетельствует об участии процесса метилирования фосфолипидов в стимуляции передачи сигналов. Этот процесс заключается в ступенчатом присоединении метильных групп к фосфатидилэтаноламину на внутренней стороне плазматической мембраны. В результате образуется фосфатидилхолин, который по механизму «качелей» появляется на внешней стороне мембраны. Препараты, угнетающие данный процесс, подавляют и хемотаксис, вызванный ф.мет-лей-фен.

Формилированные пептиды могут усиливать деградацию метилированных фосфолипидов, что сопровождается накоплением лизофосфатидилхолина и выделением арахидоновой кислоты, в основном за счет активации фосфолипазы A_2 . Степень активности различных пептидов одинакова по отношению к хемотаксису и выделению арахидоната. Для ф.мет-лей-фен ED_{50} (для последнего) состав-

ляет примерно 10^{10} М, а кривая доза- эффект смещается вправо при использовании специфических пептидных антагонистов. Мепакрин, антагонист фосфолипазы A_2 , подавляет хемотаксис и выделение арахидоната, причем кривые доза-эффект для обоих видов активности практически идентичны. Следует, однако, отметить, что мепакрин обладает и другими эффектами на клеточном уровне.

Какова же значимость подобных изменений фосфолипидов плазматической мембраны? Арахидоновая кислота служит субстратом для синтеза лейкотриенов под действием липоксигеназы, а лейкотриены оказывают глубокое влияние на нейтрофилы. Лейкотриен B_4 , в частности, является очень сильным хемотаксином и вызывает агрегацию нейтрофилов (см. главу 10). По некоторым данным, продукты липоксигенации арахидоновой кислоты могут быть внутриклеточными регуляторами нейтрофилов: 11-ОЭТЭ и 5-ОЭТЭ присутствуют в мембранах клеток, и их концентрация увеличивается при стимуляции формилированными пептидами или другими хемотаксинами. Арахидоновая кислота, как было показано, стимулирует дыхательный взрыв и дегрануляцию и сама может быть внутриклеточной передающей молекулой. Лизофосфатидилхолин, обладающий сурфактантными способностями, может участвовать в локальном изменении текучести мембран, что имеет место при трансметилировании. При активации фосфолипазы A_2 повышается уровень фактора, активирующего тромбоциты и являющегося исключительно мощным хемотаксическим веществом и медиатором воспалительных реакций (см. главу 16). Таким образом, стимулированные нейтрофилы образуют два мощных хемоаксина-ФАТ и ЛТВ $_4$, которые могут активировать другие нейтрофилы и усиливать реакцию.

Роль циклических нуклеотидов

Недавно было показано, что при экзоцитозе происходит раннее, но кратковременное повышение уровня циклического АМФ. Концентрация цАМФ достигает своего пика в самом начале выброса содержимого гранул и возвращается к исходному уровню на фоне продолжающейся дегрануляции. Предполагается, что увеличение цАМФ модулирует реакции нейтрофилов, в основном через протеинкиназу А. Вещества, повышающие уровень цАМФ, снижают реакции нейтрофилов (см. далее), од-

нако точная роль циклических нуклеотидов в нормальном функционировании нейтрофилов пока не определена.

Влияние на плотность рецепторов

Инкубация нейтрофилов с ф.норлей-лей-фен или ф.норлей-лей-фен-норлей-тир-лиз уменьшает последующее связывание с теми же мечеными пептидами. Это обусловлено не снижением аффинитета рецепторов, а уменьшением их количества. Данное явление, называемое «обратной регуляцией», зависит от дозы (рис. 23) и наблюдается также у пептидных рецепторов других типов клеток. У нейтрофилов потеря рецепторов происходит очень быстро и может достигнуть плато уже через 15 мин. Ультраструктурные исследования других типов клеток показали, что обратная регуляция включает интернализацию комплекса ли-ганд-рецептор. Интернализация этого комплекса была обнаружена и у нейтрофилов. Исследования с хемотаксическим пептидом, меченным флюоресцеином, показали, что при 4 °С рецепторы диффузно рассеяны по клеточной мембране, а при 37 °С они образуют кластеры с последующей интернализацией агрегатов в небольших везикулах, которые затем исчезают.

Возможно, существуют механизмы расщепления комплекса лиганд-рецептор с рециклингом рецепторов. Так, постоянное количество рецепторов на мембранах устанавливается через 15 мин после начала инкубации нейтрофилов с 10^7 М ф.норлей-лей-фен, а к 90-й минуте количество интернализированного пептида на 300% превышает число рецепторов, первоначально определяемых на мембране. В исследованиях с ф.нор-лей-лей-фен-норлей-тир-лиз получены доказательства протеолитического распада пептидов. При отмывании от пептидов клетка восстанавливает первоначальную способность к связыванию, а количество доступных рецепторов возвращается к нормальному уровню через 20 мин. Очевидно, белковый синтез не принимает участия ни в обратной регуляции, ни в восстановлении, поскольку циклогексимид в концентрациях, снижающих синтез белка на 92%, не влияет на эти процессы.

Приведенные данные были получены на статичных клетках, находящихся в среде с равномерной концентрацией хемоаксина. Явление обратной регуляции и рециклинга рецепторов может быть важным аспектом реакции

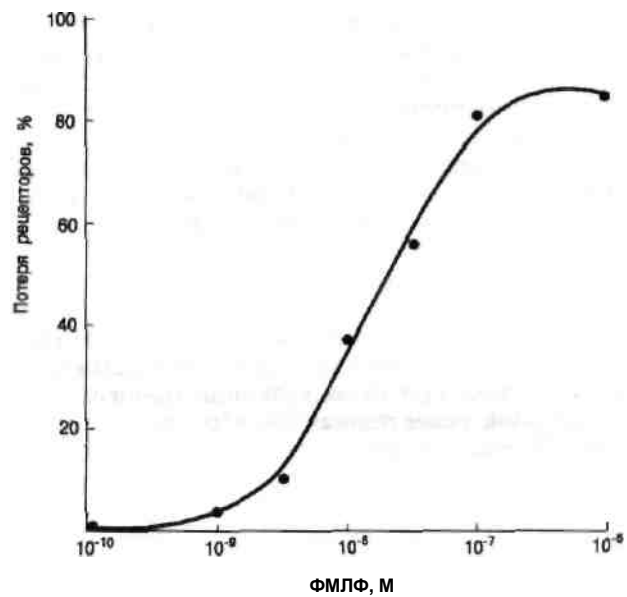


Рис. 23. Кривая доза-эффект регуляции по принципу обратной связи.

Процент потери насыщаемых рецепторов после 30-минутной инкубации при 37°C с немеченым пептидом отложен против концентрации немеченого пептида. Потеря рецептора определена как процент насыщаемого связывания 2×10^{-8} М ФНЛЛФ, меченного тритием, при инкубации без добавления немеченого пептида [Sullivan S.J., Zigmond S.H.-J. Cell. Biol., 1980, 85, 703].

нейтрофилов и в градиенте хемотаксина. Как отмечалось выше, на мембранах клеток после селективного экзоцитоза секреторных гранул возрастает количество рецепторов для ф.мет-лей-фен. Вполне вероятно, что подобный процесс имеет место и при хемотаксисе. В этом случае на клетке, особенно на ее головном конце, после активации экспрессируется больше рецепторов, чем в неактивном состоянии (см. рис. 14). Показано, что специфические гранулы служат хранилищем рецепторов для ф.мет-лей-фен (и для других поверхностных лигандов, например для СЗбi); количество содержащихся в них рецепторов в 30 раз превышает число рецепторов на плазматических мембранах. При движении клетки по градиенту хемотаксина поверхностные рецепторы, взаимодействующие с хемотаксинами, интернализируются, комплекс лиганд-рецептор распадается, а пептиды деградируют в азурофильных гранулах. В то же время по мере слияния мембран специфических гранул с плазматической мембраной на головном конце клетки появляются другие свободные рецепторы.

Сопряжение сигнал-активация при различных реакциях нейтрофилов

Из вышеизложенного следует, что различные реакции нейтрофилов обеспечиваются разными передаточными механизмами. На рис. 24

дана упрощенная схема взаимодействия передающих механизмов при хемотаксисе и фагоцитозе. Ключевым внутриклеточным посредником в этих процессах, вероятно, является кальций, а активация протеинкиназы С модулирует преимущественно отрицательные эффекты. «Двигатель» имеет важное значение в дополнение к активации гельзолина и киназы легкой цепи миозина, которые регулируют полимеризацию и перекрестное связывание актина, необходимо увеличение количества актина, связанного с клеточным скелетом. Как было показано, этот процесс протекает быстро при стимуляции нейтрофилов хемотаксином, таким как ф.мет-лей-фен. Установлено, что индуцированный лигандом обмен полифосфоинозитидов сам по себе служит сигналом к началу полимеризации, а ФИФ_2 вызывает быструю и эффективную диссоциацию профилактин (комплекс профилин-актин-неполимеризованная форма актина) с последующей полимеризацией. Однако взаимодействие ФИФ_2 , кальция и гельзолина является достаточно сложным. Недавние исследования в лаборатории Stossel показали, что способность гельзолина к фрагментированию нитей актина (см. главу 18) выше при отсутствии кальция и что ФИФ_2 , связываясь с гельзолином, может подавлять эту способность. С другой стороны, при микромолярной концентрации кальция гельзолин связывает

мономеров актина и в этой форме стабилизирует ядра, уже начавшие полимеризацию актина; однако в тех же условиях гельзолин может блокировать обмен мономеров с быстрым ростом «бородатых» концов нитей актина. Удаление кальция и(или) присутствие ФИФ₂ приводят к отделению актиновых мономеров от гельзолина, что блокирует последний эффект гельзолина и, следовательно, ускоряет полимеризацию актина.

Протеинкиназа С, по-видимому, является главным активатором дыхательного взрыва. Об этом свидетельствует угнетение дыхательного взрыва при использовании сфингоидных оснований, селективных ингибиторов ферментов. Однако не исключено участие двух (или более) метаболических путей; по имеющимся данным, арахидонат также может играть здесь определенную роль.

На рис. 25 схематически представлены некоторые функциональные возможности нейтрофилов при реакциях клетки *in vivo*.

Фармакологическая регуляция функций нейтрофилов

Препараты, повышающие уровень циклического аденозинмонофосфата (цАМФ)

Дибутирил цАМФ, теофиллин и другие вещества, повышающие уровень цАМФ, угнетают различные функции нейтрофилов, включая хемотаксис, антителозависимую цитотоксичность и экзоцитоз, вызванный опсонизированным зимозаном у нейтрофилов, обработанных цитохалазином В. Среди веществ, обладающих этими свойствами, следует отметить гистамин, простагландины Е₁, Е₂ и I₂, а также агонисты адренорецепторов.

Агонисты адренорецепторов, такие как изопреналин, изменяют реакции нейтрофилов, воздействуя на клетки через β -рецепторы. Однако условия проведения фармакологических исследований по идентификации рецепторов не всегда строго соблюдались, поэтому полученные результаты трудновос-

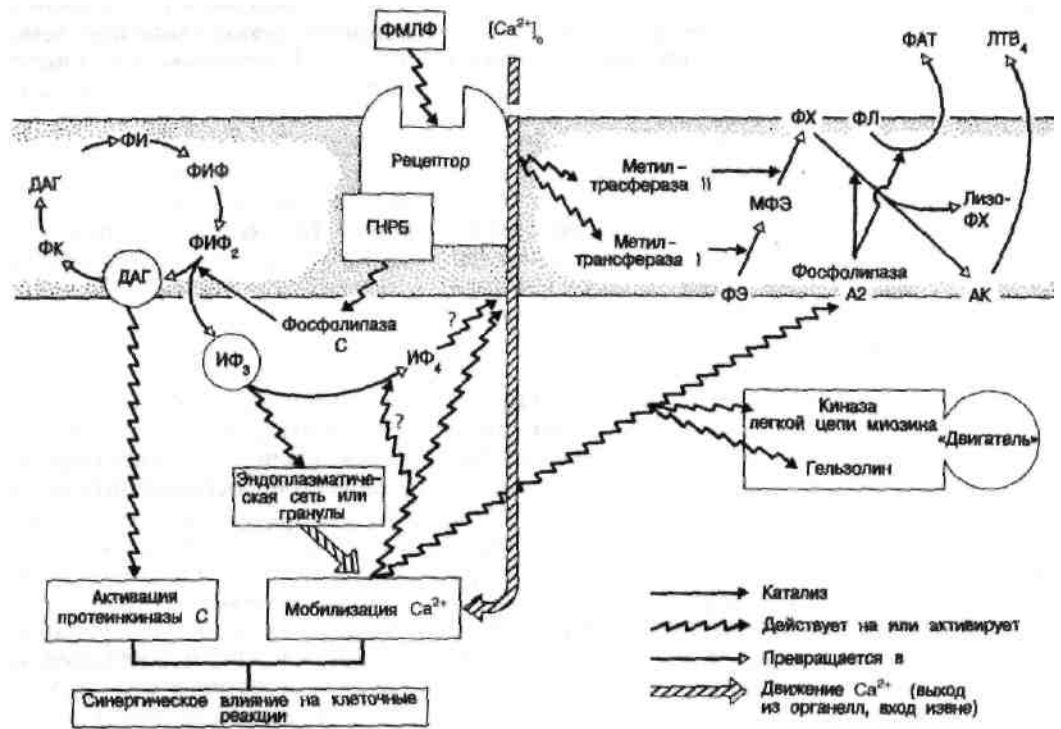


Рис. 24. Возможные взаимосвязи различных передаточных механизмов хемотаксиса.

ФХ - фосфатидилхолин; ФЭ- фосфатидилэтаноламин; МФЭ- мометилфосфатидилэтаноламин; ФЛ - фосфолипид; ГНРБ - гуаниннуклеотид-регуляторный белок; ФИ - фосфатидилинозитол; ФИФ- фосфатидилинозитол-фосфат; ФИФ₂ - фосфатидилинозитол-дифосфат; ИФ₃ - инозитолтрифосфат; ДАГ- диацилглицерол; ИФ₄ - инозитолтетрафосфат; ФК-фосфатидиловая кислота; ФАТ-фактор активации тромбоцитов; ЛТВ₄ - лейкотриен В₄.

производимы. Однако исследования связывания с радиоактивным антагонистом, которые проводились после предварительной обработки нейтрофилов лизосомотропными препаратами для предупреждения распада аминов в лизосомах, указывают на возможное существование р-адренорецепторов.

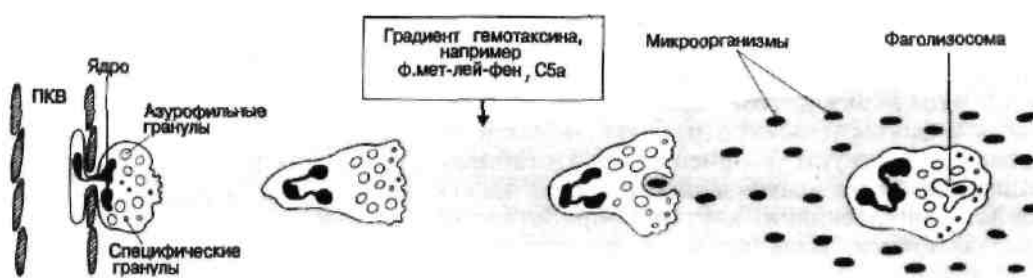
Гистамин уменьшает экзоцитоз, вызванный зимозаном у нейтрофилов, стимулированных цитохалазином В; однако данные, полученные при воспроизведении в разных лабораториях, весьма вариабельны.

Простагландин E₂ вызывает дозозависимое подавление экзоцитоза; при высокой концентрации 2,8 · 10⁻⁴ М отмечается 37% подавление. (Это контрастирует с его действием

на трансформацию лимфоцитов, которое наблюдается при концентрации в 10 000 раз более низкой.)

Вещества, **повышающие уровень циклического гуанозин-3,5-монофосфата (цГМФ)**

Агонисты холинергических рецепторов повышают уровень цГМФ в нейтрофилах и уменьшают внеклеточную гибель клеток-мишеней, покрытых антителами. Результаты исследований связывания хиналдинилбензилата указывают на возможность существования мест связывания ацетилхолина на нейтрофилах; однако доказательства наличия холинергических рецепторов на нейтрофилах в целом неубедительны.



Хемотаксис

Взаимодействие хемотаксина - рецептор: локализованный гидролиз ФИФ, вызывает образование ИФ, +ДАГ на головном конце клетки. ИФ мобилизует Ca²⁺, обуславливая вход Ca²⁺. [Са²⁺] активирует киназу легкой цепи миозина, которая стимулирует «двигатель», в результате чего происходит движение клетки вперед. ДАТ быстро удаляется ДАГ-киназой, поэтому активация ПКС минимальна. Фосфорилирование липокортина ПКС или другой киназой: активация Ф/А при повышении Ca²⁺, вследствие чего происходит образование ФАТ и ЛТВ₄ в переднем конце клетки, что повышает градиент (для этого необходимо примирование другими цитокинами). ПКС и Ca²⁺ обладают синергизмом при индукции повторных слияний специфических гранул с мембраной, что приводит к экспрессии скрытых хемотаксических рецепторов на переднем конце клетки. Комплексы лиганд-рецептор интернализуются и расщепляются, а рецепторы рециклируются. При слиянии специфических гранул с плазматической мембраной увеличивается также экспрессия рецепторов к СЗЬ и, возможно, к Fc.

Фагоцитоз и гибель микроорганизмов



Высокие концентрации хемотаксина замедляют движение. Повторные взаимодействия рецепторов к СЗЬ и Fc с опсонинами и микроорганизмами приводят к трехмерному эффекту «молнии», причем каждое взаимодействие вызывает местный обмен ИФ₂ с образованием ИФ₃ и ДАТ. ИФ₃ мобилизует Ca²⁺, который контролирует «двигатель-поглощающих псевдоподий, а также активирует ФЛА₂ генерирующую АК и лизофосфатидилхолин. Азурофильные гранулы сливаются с фагосомами, образуя фаголизосомы. Высокий уровень [ДАТ] поддерживается расходом ФИ при участии ФЛС. ДАТ активирует ПКС, которая в синергизме с Ca²⁺ (и, возможно, с АК) стимулирует NADPH-оксидазу. Повышенная активность ПКС уменьшает обмен ФИФ₂ и снижает [Ca²⁺] за счет активации выхода Ca²⁺. ПКС активирует NaVH⁺-протivotок и ощелачивает фаголизосомы. Микроорганизмы убиваются токсическими продуктами O₂ и др., а впоследствии перевариваются лизосомными ферментами.

Рис. 25. Схема некоторых функций нейтрофилов, участвующих в первой линии защиты от микроорганизмов in vivo.

ПКВ-посткапиллярные вены; ФИФ₂-фосфатидилинозитол-дифосфат; ДАГ-диацилглицерол; ПКС-протеинкиназа С. Остальные сокращения см. на рис. 24.

Препараты, влияющие на микротрубочки

Колхицин и винбластин вызывают растворение микротрубочек, связываясь с тубулином и препятствуя его полимеризации; однако окончательная интерпретация эффектов этих препаратов осложняется тем, что под их действием может нарушаться процесс мембранного транспорта. Какое же влияние на функции нейтрофилов оказывают препараты данной группы? Колхицин и винбластин уменьшают экзоцитоз, но при концентрациях, практически элиминирующих микротрубочки, дегрануляция снижается только на 40%. Микротрубочки, по-видимому, более специфически вовлекаются в пространственные взаимоотношения внутриклеточных органелл и плазматической мембраны. Препараты, вызывающие сборку или дезагрегацию микротрубочек, могут влиять на вероятность контакта между гранулой и плазматической мембраной, однако ясно, что в экзоцитозе принимают участие и другие факторы. Микротрубочки, по общему мнению, участвуют в ориентации и стабилизации клеток во время движения. При электронной микроскопии клетки, обработанной хемотаксинами, выявляется увеличение полимеризации. Участие микротрубочек в этом процессе до конца не ясно. Хотя в некоторых исследованиях отмечается снижение хемотаксиса под действием винбластина и колхицина, в ряде других работ обнаруживается лишь слабый эффект этих препаратов. Прямое наблюдение показало, что после обработки указанными препаратами движение нейтрофилов по градиенту хемотаксина напоминает прогулку пьяного.

Не менее противоречивые данные получены при изучении влияния колхицина на индукцию внеклеточной гибели: отсутствие эффекта в одном исследовании и 50% подавление в другом.

Заключение

Нейтрофил-конечная клетка, неспособная к делению, с ограниченными возможностями синтеза белка; тем не менее диапазон ее реакций весьма широк и включает хемотаксис, фагоцитоз, экзоцитоз, индукцию как внутриклеточной, так и внеклеточной гибели. В нейтрофилах имеется по крайней мере два типа гранул, содержимое которых обладает микробидной активностью и оказывает действие на другие клетки и компоненты тканей. Нейт-

рофилы снабжены множеством различных рецепторов, которые позволяют им реагировать на градиент хемотаксина, распознавать бактерии и многие чужеродные вещества, взаимодействовать с ними. На примере взаимодействия нейтрофилов с синтетическим пептидом ф.метлей-фен показано, что для реакции клетки необходимо участие стереоспецифических рецепторов, активация которых вызывает обмен полифосфоинозитидов, увеличение внутриклеточного пула обмениваемого кальция и активацию протеинкиназы С. Передаточный механизм может включать активацию фосфолипазы А₂ с последующим образованием фактора, активирующего тромбоциты, арахидонат и лейкотриен В₄; возможно также участие локального увеличения текучести мембраны.

После образования комплекса лиганд-рецептор последний интернализируется, рецепторы подвергаются рециклингу и вновь появляются на мембране. Одним из эффектов повышения концентрации кальция является активация «мотора» - микрофиламентной сети актин-АСБ с миозином, которая включает активность гельзолина и стимуляцию киназы легкой цепи миозина. Клеточная подвижность, фагоцитоз и экзоцитоз зависят также от элементов, генерирующих силовое напряжение. Микротрубочки участвуют в стабилизации клеток во время их реакции, а циклические нуклеотиды модулируют активность нейтрофилов. Однако доказательство существования специфических рецепторов для фармпрепаратов, обычно вызывающих изменения уровня циклических нуклеотидов, весьма неоднозначны. Нейтрофилы обладают запасом гликогена и получают энергию главным образом при метаболизме углеводов. Фагоцитоз и индукция внеклеточной гибели сопровождаются увеличением потребления кислорода с образованием перекисей и других токсических продуктов кислорода; те же эффекты наблюдаются при других видах активации нейтрофилов.

Список литературы

- Berridge M.J. & Irvine R.F. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315. K/ebanoff M.J. & Clark R.A. (1978) *The Neutrophil: Function and Clinica/ Disorders*. North Holland, Amsterdam.
- Nishizuka Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and human promotion. *Nature* 308, 693. Snyderman R. (1984) *Contemporary Topics in Immunology*, vol. 14. Academic Press, London. Wilkinson P. C (1982) *Chemotaxis and Inflammation*, 2nd ed. Churchill-Livingstone, Edinburgh.

4 Тромбоциты

Дж. К. Формен (J. C. Foreman)

Целью данной главы является краткая характеристика структуры, стимулов, биохимии и фармакологии тромбоцитов с учетом их возможной роли в воспалительной реакции. Отдельная глава (см. главу 16) будет посвящена медиатору, известному как фактор активации тромбоцитов.

Представления о роли тромбоцитов в воспалении или других иммунных реакциях весьма противоречивы. Участие тромбоцитов в подобных реакциях не вызывает особых сомнений; вопрос заключается в определении их значимости и пользы либо в констатации отсутствия какого-либо их вклада в эти процессы. Утверждается, что устранение тромбоцитов не изменяет воспалительных реакций, однако это не означает обязательного отсутствия активной и функциональной роли тромбоцитов в таких процессах. Из последующих глав станет очевидным, что воспаление — это многокомпонентный процесс с множеством альтернативных и перекрещивающихся связей. Следовательно, выпадение какого-то одного компонента может не повлиять на исход процесса, поскольку выпавший компонент нередко замещается. В дополнение к этому следует сказать, что тромбоциты активируются множеством различных стимулов, что объединяет их с тучными клетками и нейтрофилами; более того, они выделяют значительное количество медиаторов воспаления с широким спектром действия. Все это чрезвычайно усложняет задачу определения истинного участия тромбоцитов в иммунных и воспалительных реакциях.

Структура тромбоцитов

Тромбоциты ввиду отсутствия в них ядра не могут быть определенно отнесены к клеткам. Они являются фрагментами больших мегакариоцитов костного мозга и обнаруживаются в циркулирующей крови, а не в тканях (за исключением патологических состояний). Продолжительность жизни тромбоцитов в циркуляции составляет 8-14 дней; в 1 мкл

крови содержится $10^5 - 5 \cdot 10^6$ тромбоцитов. Из одного мегакариоцита образуется 3000-4000 тромбоцитов; их продукция, по-видимому, контролируется тромбопоэтином, гуморальным фактором печени или почек.

Интактный тромбоцит имеет вид диска диаметром 0,75-2,25 мкм. Несмотря на отсутствие ядра цитоплазма содержит некоторое количество РНК, поэтому тромбоциты способны к ограниченному белковому синтезу. Мембрана, окружающая цитоплазму, состоит из двух слоев фосфолипидов, между которыми располагаются белки (трехслойная структура, типичная для клеток-эукариотов). Внешняя поверхность мембраны покрыта аморфным слоем толщиной 20 нм, который состоит из белков и сульфатированных протеогликанов. Функциональное значение аморфного слоя определяется тем, что среди всех прочих веществ в нем содержатся факторы свертывания.

В результате инвагинации поверхностной мембраны в цитоплазме образуется сложная система канальцев, которые сообщаются с поверхностью тромбоцита. Возможно, что вещества, выделяемые гранулами тромбоцитов, сначала попадают в эту систему канальцев и лишь затем окончательно высвобождаются во внешнюю среду. С системой канальцев, сообщаемых с поверхностью, тесно связана плотная тубулярная система. Подобно саркоплазматическому ретикулуму мышц, плотная тубулярная система может участвовать в секвестрации и хранении кальция в тромбоцитах.

Значительная часть цитоплазмы тромбоцита заполнена гранулами, которые разделяют на три основных типа: 1) плотные гранулы; 2) α-гранулы; 3) гранулы, содержащие кислые гидролазы.

Кроме того, цитоплазма содержит некоторое количество гранул гликогена и немного митохондрий.

Плотные гранулы

Эти гранулы содержат АТФ, АДФ, пирофосфат, бивалентный катион (кальций либо маг-

ний) и 5-окситриптамин (у человека) или гистамин (у кролика). 5-Окситриптамин не синтезируется тромбоцитами, но, по-видимому, захватывается ими и хранится в плотных гранулах. АТФ плотных гранул не входит в метаболический пул АТФ тромбоцитов, и его обмен осуществляется крайне медленно по сравнению с обменом обычного пула АТФ.

α-Гранулы

Это гетерогенная группа гранул, содержащих фибриноген, фактор 4 (ФТ4) и его предшественник, набор основных белков с разными формами активности (хемотаксической, усиливающей рост, повышающей проницаемость), а также различные гликопротеины, в том числе фибронектин и тромбоспондин. Исследование состава α-гранул показало, что часть их содержимого является результатом экзоцитоза из окружающей среды. Однако фибриноген, входящий в состав этих гранул, по-видимому, отличается от плазменного и может синтезироваться мегакариоцитами, из которых происходят тромбоциты.

Гранулы, содержащие кислую гидролазу

Данные гранулы морфологически неотличимы от α-гранул, но, вероятно, они не выделяются из тромбоцитов в результате секреции. Среди ферментов, идентифицированных в этих гра-

нулах, находятся следующие: катепсины А, С и D; коллагеназа; эластаза; beta-глюкуронидаза; beta-N-ацетилглюкозаминидаза; beta-глюкозидаза; Р-галактозидаза; α-галактозидаза; α-глюкозидаза; α-маннозидаза; α-арабинозидаза; beta-ксилозидаза; арилсульфатаза; beta-глицерофосфатаза.

Тромбоциты способны изменять свою форму благодаря (в определенной мере) наличию микрофиламентов и микротрубочек в цитоплазме. Микротрубочки располагаются по периферии цитоплазмы и поддерживают форму диска у интактных тромбоцитов. Микрофиламенты содержат контрактильные белки и принимают участие в агрегации. Помимо различных форм актина и миозина, в тромбоцитах содержатся регуляторные белки, например киназа легкой цепи, кальмодулин, гельзолин и профилин. Основные структуры тромбоцита представлены на рис. 26.

Реакции тромбоцитов и их определение

Тромбоциты способны к следующим реакциям: 1) изменение формы; 2) адгезия; 3) агрегация; 4) выделение (или секреция) содержимого гранул; 5) выделение метаболитов арахидоната. В зависимости от интенсивности и природы стимула общий ответ тромбоцитов может включать все перечисленные реакции или только некоторые из них. Величина лю-

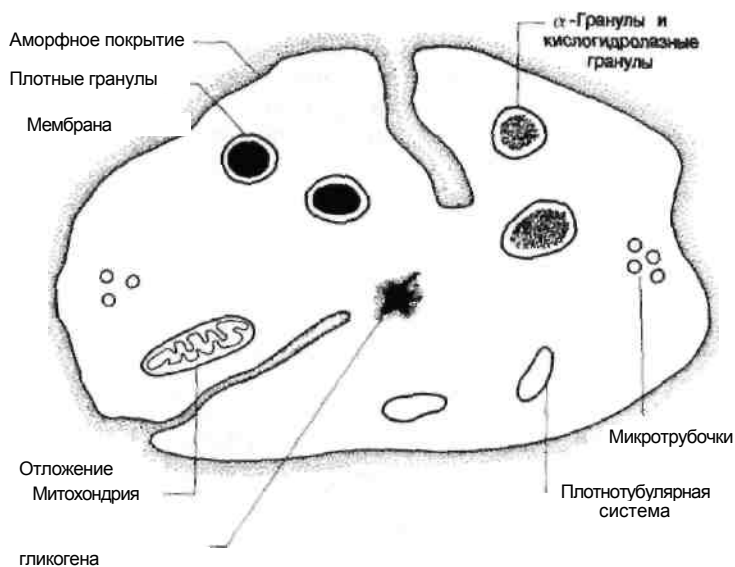


Рис. 26. Внутриклеточные структуры тромбоцита.

бого конкретного ответа также определяется типом стимула.

Изменение формы и адгезия

Изменение формы тромбоцита заключается в переходе из нормальной дисковидной формы в неправильную, с вдавлениями на поверхности и псевдоподиями. Реакция в виде изменения формы может наблюдаться и без выделения или агрегации и в отличие от других реакций не зависит от внутритромбоцитарного кальция или изменений внутритромбоцитарного уровня циклического АМФ. Адгезия тромбоцитов к поверхности сопровождается образованием псевдоподий и изменениями формы, которые аналогичны индуцируемому стимулом в отсутствие какой-либо поверхности.

Агрегация

Агрегация, или прикрепление тромбоцитов друг к другу с образованием агрегата, в отличие от реакции изменения формы зависит от внутритромбоцитарного кальция и наличия фибриногена на поверхности тромбоцитов. Первая фаза агрегации (см. ниже) наблюдается, когда под влиянием стимула происходят конформационные изменения в паре поверхностных белков-гликопротеинов Пб/Ша. Конформационные изменения позволяют данным белкам связывать фибриноген, который является двухвалентным лигандом и, следовательно, может вызвать агрегацию тромбоцитов в результате образования перекрестных связей. Для второй фазы агрегации требуется секреция α -гранул, что зависит от образования в тромбоцитах тромбоспандина A_2 . α -Гранулы содержат тромбоспандин, который при выделении связывается с фибриногеном первой фазы агрегации, стабилизирует агрегат и усиливает агрегацию.

Секреция

Секреция тромбоцитов обнаруживает немало сходства с другими секреторными процессами и не сводится к простому выделению из тромбоцита в результате его лизиса, а представляет собой экзоцитоз, при котором содержимое гранул селективно высвобождается из тромбоцита в окружающую среду. Действительно, выделение из гранул различных типов может происходить независимо, оно определяется

лишь природой стимула. Высвобождение плотных гранул иногда относят к секреции I, тогда как выброс из гранул, содержащих ферменты, - к секреции II. Секреция I связана с метаболизмом арахидоната и, вероятно, требует синтеза простагландиновых эндоперекиси-сей, так как она невозможна у тромбоцитов, обработанных ацетилсалициловой кислотой (см. главы 10 и 25). Различные стимулы, вызывающие реакции тромбоцитов, включают АДФ, адреналин, 5-окситриптамин, ФАТ, тромбоксан A_2 и ПГ G_2/H_2 , а также тромбин и коллаген. Из этого списка ясно, что тромбоциты содержат (или могут синтезировать при стимуляции) вещества, которые сами являются стимуляторами тромбоцитов. Таким образом, некоторые стимулы могут вызвать прямой ответ тромбоцитов, который может накладываться на вторичный (или непрямой) ответ при выделении веществ, а именно: метаболитов арахидоната и АДФ.

Измерение агрегации

Классическим методом контроля реакций тромбоцитов является определение изменений оптической плотности перемешиваемой суспензии тромбоцитов. На рис. 27 показана кривая, полученная с помощью агрегометра, измеряющего оптическую плотность.

Реакция на АДФ приведена для примера ситуации, когда первоначальное уменьшение пропускания света через суспензию связано с изменением формы тромбоцитов. Аналогичные реакции с изменением формы были получены при применении тромбина и коллагена. При стимуляции тромбоцитов адреналином подобный эффект отсутствует. Временное уменьшение оптической плотности сменяется ее увеличением, о чем свидетельствует плато. Это начальное увеличение определяется прямым агрегирующим действием АДФ на тромбоциты и называется первой фазой агрегации. Позже происходит дальнейшее увеличение оптической плотности (вторая фаза агрегации), которое связано с действием агрегирующих веществ, выделяемых из тромбоцитов при стимуляции (см. ниже). Таким образом, вторая фаза агрегации вызывается опосредованно и в случае АДФ может отменяться ацетилсалициловой кислотой, что указывает на участие метаболитов арахидоната.

При других стимулах кривые агрегации имеют иной вид. Коллаген, например, индуцирует только вторую фазу агрегации после

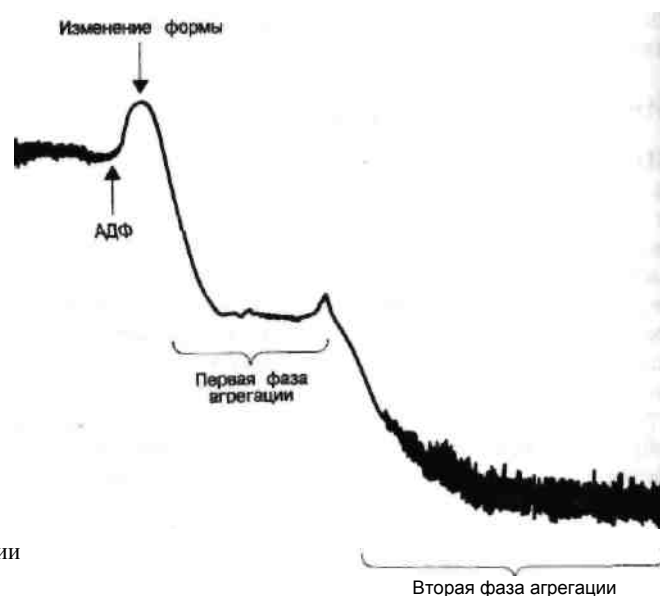


Рис. 27. Типичная кривая агрегометрии при стимуляции суспензии тромбоцитов АДФ.

первоначального изменения формы и не вызывает какого-либо прямого агрегационного ответа. АДФ, 5-окситриптами, адреналин, тромбин и перекиси простагландинов вызывают как прямую, так и непрямую (т. е. вторую фазу) реакции агрегации.

Рецепторы

Тромбин

Тромбин является ферментом, катализирующим превращение фибриногена в фибрин; в то же время это один из наиболее мощных стимуляторов тромбоцитов. Активация тромбоцитов тромбином специфична, зависит от концентрации и рН среды и подавляется ингибиторами тромбина, т.е. имеет характеристики ферментативной реакции. Тромбин вызывает активацию тромбоцитов достаточно быстро (выявление менее чем через 10 с). Тромбоциты могут сенсibilizироваться к высоким дозам тромбина после их обработки подпороговыми концентрациями фермента. Исследования связывания не принесли успеха в отношении идентификации тромбинового рецептора. Примерно 500 мест связывания на тромбоците имеют высокий аффинитет к тромбину (константа диссоциации около 1 нМ); существует еще 50000 мест насыщаемого связывания на каждом тромбоците (константа диссоциации около 100 нМ). Ненасыщаемое

связывание составляет 25-75% общего связывания. Ни одно из мест связывания, как было четко показано, не является необходимым для активации тромбоцитов. Кроме того, некоторые аналоги тромбина активируют тромбоциты без насыщения. При равновесии большая часть тромбина находится в свободной форме, а связанный тромбин с течением времени становится недиссоциируемым от мест его связывания. Возможным объяснением этому служит предположение о том, что тромбин активирует тромбоциты, оказывая ферментативное действие на некий тромбоцитарный субстрат; при этом тромбин изменяется или подвергается процессингу.

Возможным кандидатом на мишень для действия тромбина является очень небольшой компонент поверхности тромбоцита, известный как гликопротеин V, который гидролизуется при низких концентрациях тромбина. Установлено, что для полной активации тромбоцита необходим гидролиз менее 2% гликопротеина V и что реакция тромбоцитов определяется не общим количеством гидролизуемого субстрата, а скоростью гидролиза. Однако против концепции о гликопротеине V как о мишени для тромбина свидетельствует тот факт, что другие протеолитические ферменты, гидролизующие гликопротеин V, не вызывают активации тромбоцитов, хотя возможно, что эти ферменты индуцируют гидролиз определенного типа, не сопряженный с реакцией тромбоцитов.

АДФ

АДФ, высвобождающийся из поврежденных (при травме) клеток в сосудистое русло, относится к наиболее важным физиологическим стимулам тромбоцитов. Рецепторы к АДФ на тромбоцитах отличаются от пуриновых рецепторов других клеток прежде всего тем, что для них АТФ является антагонистом, а не агонистом, как в случае других клеток. При использовании [β - 32 P]-2-азидо-АДФ выявлен единственный тип связывания с плотностью около 500 мест на каждом тромбоците. Константа диссоциации для подавления связывания АТФ имеет близкое значение с константой диссоциации при подавлении АТФ АДФ-индуцированной агрегации. АДФ-рецептор тромбоцитов обладает высокой степенью стереоспецифичности и другими структурными особенностями. Гуанин-, уридин- и цитозиндифосфат неспособны вызвать агрегацию тромбоцитов. Для полной активности в отношении рецептора необходимы рибоза АДФ и 5-дифосфатная цепь АДФ. Как уже упоминалось выше, АТФ и АМФ являются антагонистами. Замены в 8-м и 6-м положениях пуринового кольца снижают активность, а некоторые замены во 2-м положении ее повышают. Так, 2-хлор-АДФ и 2-азидо-АДФ являются более мощными стимуляторами агрегации тромбоцитов, чем сам АДФ.

Аденозин подавляет агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ. Это подавление не является специфичным для АДФ-индуцируемой активации тромбоцитов, и рецепторы, опосредующие ингибиторный эффект аденозина, отличаются от пуриновых рецепторов, опосредующих действие АДФ на тромбоциты. Аденозин, действуя через собственный рецептор, активирует аденилатциклазу, в результате чего уровень циклического АМФ в тромбоцитах повышается, приводя к подавлению реакций тромбоцитов. Если активация аденозинового рецептора приводит к стимуляции аденилатциклазы, то АДФ через свой рецептор вызывает ее подавление. В качестве ингибитора аденилатциклазы АДФ почти эквипотентен самому себе в качестве агрегирующего агента. Отсюда возникает вопрос о взаимосвязи этих эффектов. Однако значительная часть данных свидетельствует не в пользу гипотезы об опосредовании агрегации тромбоцитов подавлением аденилатциклазы и снижением уровня цАМФ тромбоцитов. Вазопрессин агрегирует тромбоциты, но не подавляет аденилатцикла-

зу. 2', 5'-Дидезоксиаденозин подавляет аденилатциклазу, причем он не только сам не вызывает агрегации тромбоцитов, но и не потенцирует агрегационный эффект АДФ. Аналоги АДФ-АДФaS и АДФbetaS индуцируют агрегацию, но не подавляют аденилатциклазу. При использовании ряда конкурентных антагонистов АДФ было показано, что значение rA_2 для АДФ-индуцированной агрегации хорошо коррелирует с rA_2 для подавления аденилатциклазы, которое вызвано АДФ. Таким образом, один и тот же АДФ-рецептор, вероятно, опосредует агрегацию и подавление активности аденилатциклазы, но подавление аденилатциклазы не опосредует агрегацию.

Адренорецепторы

Агрегация тромбоцитов человека адреналином опосредуется через α -адренорецепторы. Интересно, что агрегации, вызванной адреналином, не предшествует реакция изменения формы (см. выше). На тромбоцитах млекопитающих выявлены и ρ -адренорецепторы, опосредующие подавление агрегации. У неprimатов адреналин не агрегирует тромбоциты, но усиливает агрегацию, вызванную другими стимулами.

α -Адренорецепторы на тромбоцитах относятся к α_2 -подтипу и селективно блокируются α_2 -антагонистом - йохимбином. На основании определенного антагонистического действия клонидина в отношении α -рецептора тромбоцитов предполагается, что данный рецептор относится к α_3 -подтипу. Однако в настоящее время установлено, что клонидин действует как частичный агонист, поэтому фармакология α -адренорецептора тромбоцитов находится в полном соответствии с характеристиками α_2 -подтипа. α_1 -Адренорецептор также вносит свой вклад в процесс агрегации, так как α_1 -агонист - метоксамин - стимулирует агрегацию тромбоцитов, полученных от некоторых доноров. Изучение связывания с мечеными лигандами подтвердило выводы относительно существования на тромбоцитах α_2 -, но не α_1 -адренорецепторов.

Рецепторы к эйкозаноидам

Простагландины B_1 и D_2 , а также проста-циклин (PGI_2) подавляют агрегацию тромбоцитов, стимулируя аденилатциклазу и повышая внутритромбоцитарную концентрацию цАМФ. При использовании радиоактивных агонистов наблюдается более сложная картина

взаимоотношений. Для ПГ_1 на тромбоцитах выявлено два типа мест связывания: высокоаффинные с константой диссоциации (K_D) около 10 нМ и низкоаффинные с K_D , примерно равной 1 мкМ. Связывание ПГЕ_1 также происходит в двух местах при K_D 60 нМ и 2 мкМ, а ПГД_2 обладает одним местом связывания при K_D 50 нМ. Связанный ПГЕ_1 замещается немеченым ПГЕ_X или ПГ_2 , но он резистентен к замещению ПГД_2 . Аналогично этому связанный ПГ_2 вытесняется немечеными ПГЕ , и ПГ_2 , но не ПГД_2 . Эти данные свидетельствуют о связывании ПГЕ_1 и ПГ_2 с общим рецептором, который отличается от рецептора для ПГД_2 . Такой вывод соответствует результатам исследований с использованием антагонистов, таких как ди-4-флоретинфосфат, которые препятствуют антиагрегационному эффекту ПГД_2 , но не ПГ_2 и ПГЕ_X .

В отличие от ПГЕ_1 ПГД_2 и ПГ_2 , подавляющих активацию тромбоцитов, тромбоксан $A_2(TA_2)$ вызывает агрегацию тромбоцитов. TA_2 индуцирует полный набор реакций тромбоцитов: изменение формы, агрегацию и секрецию. Тромбоциты при метаболизме арахидоната образуют *inter alia* эндоперекиси и TA_2 . Эндоперекиси самостоятельно активируют тромбоциты; так, ПГH_2 индуцирует агрегацию в присутствии ингибитора тромбоксан-синтетазы-дазоксибена.

При изучении связывания меченого аналога ПГH_2 выявлено по крайней мере три типа мест связывания. На один из них с плотностью около 1700 мест на каждом тромбоците приходится более половины максимального связывания лиганда в концентрации 70 нМ; по-видимому, он имеет наибольшую вероятность представлять рецептор, что основывается на сравнении активности агониста и антагониста при вытеснении связанного лиганда и при действии на агрегацию тромбоцитов.

Фактор активации тромбоцитов

Фактор активации тромбоцитов- 1-0-алкил-2-ацетил-sn-глицерил-3-фосфорилхолин (ФАТ-ацетоэфир, или ФАТ)-вызывает изменение формы, агрегацию и секрецию тромбоцитов; однако он способен, несмотря на свое название, оказывать действие и на многие другие типы клеток (см. главу 16). Синтезированы антагонисты ФАТ, многие из которых обладают селективностью; некоторые из них являются конкурентными антагонистами и по-

этому используются для идентификации и классификации рецепторов для ФАТ. В настоящее время предполагается существование более чем одного типа рецепторов, причем рецепторы тромбоцитов обладают сходством с рецепторами других тканей. При использовании меченого тритием ФАТ-ацетоэфира для изучения связывания с тромбоцитами человека выявлено два типа мест связывания: с высоким аффинитетом (K_D около 0,3 нМ) и с более низким аффинитетом (K_D примерно 10 нМ).

Механизм передачи сигнала

Кальций

Кальций, несомненно, играет важнейшую роль в превращении лиганд-рецепторного взаимодействия на мембране тромбоцита в клеточную реакцию. Кальциевые ионофоры, такие как A23187 и иономицин, могут вызывать все реакции тромбоцитов, изменение формы, агрегацию и секрецию. Однако роль кальция зависит, во-первых, от стимула и, во-вторых, от типа вызываемой реакции. Например, стимуляция α -адренорецепторов вызывает агрегацию и секрецию посредством механизмов, независимых от кальция. Тромбин, с другой стороны, индуцирует реакции тромбоцитов, которые частично зависят от внеклеточного кальция и в большей степени-от выделения кальция из внутриклеточных депо, тогда как реакция на АДФ в основном определяется внеклеточным кальцием.

Ценная информация была получена при измерении внутритромбоцитарной концентрации свободного кальция, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, с помощью индикатора квин-2. Изменение формы начинается при превышении $[\text{Ca}^{2+}]_i$ порогового значения (около 300 нМ), а максимальный эффект наблюдается при $[\text{Ca}^{2+}]_i$ равном 800 нМ. При таких уровнях кальция агрегация и секреция не регистрируются. Следует отметить, что некоторые стимуляторы тромбоцитов, такие как АДФ и тромбин, могут вызвать изменение формы при $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ниже 300 нМ. Из этого можно предположить существование второго передатчика.

Первичная агрегация (или первая фаза агрегации) предполагает наличие на мембране тромбоцитов фибриногеновых рецепторов в виде гликопротеинов Pb/IIIa . Для возникновения первичной агрегации уровень

$[Ca^{2+}]_i$ должен повыситься примерно до 1 мкМ.

В то время как подобное повышение $[Ca^{2+}]_i$ может вызвать первичную агрегацию, как в случае изменения формы, некоторые стимулы индуцируют первую фазу агрегации без увеличения $[Ca^{2+}]_i$ до 1 мкМ. Если $[Ca^{2+}]_i$ повышается ионофором приблизительно до 600 нМ, наблюдается изменение формы, но не агрегация. Добавление АДФ или тромбина в этих условиях может вызвать агрегацию без дальнейшего увеличения $[Ca^{2+}]_i$, что опять-таки указывает на участие второго передатчика.

Для секреции гранул тромбоцитов также требуется повышение $[Ca^{2+}]_i$ примерно до 1 мкМ; как и в случае изменения формы и первичной агрегации, индукция секреции тромбином, ФАТ и другими стимулами возможна при уровне $[Ca^{2+}]_i$ намного ниже 1 мкМ, что также свидетельствует в пользу участия второго передатчика.

Фосфоинозитиды

Как и у многих других клеток, взаимодействие лиганд-рецептор на мембране тромбоцитов активирует фосфолипазу С, которая влияет на фосфатидилинозитол, фосфатидилинозитол-4-фосфат и фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат, в результате чего образуются диацилглицерол (ДАГ), инозитол-1,4,5-трифосфат (ИФ₃), инозитол-1,4-дифосфат и инозитол-1-фосфат. ИФ₃ действует как второй передатчик, выделяя кальций из внутриклеточных депо и повышая $[Ca^{2+}]_i$, а ДАГ активирует протеинкиназу С. Активация тромбоцитов тромбином, ФАТ и тромбоксаном А₂ вызывает гидролиз фосфоинозитидов с образованием ИФ₃ и ДАГ. Данные относительно индукции гидролиза фосфоинозитидов под действием АДФ весьма противоречивы. Возможно, АДФ вызывает гидролиз, но в меньшей степени, чем, например, тромбин.

Как уже отмечалось, секреция тромбоцитов в ответ на тромбин и ФАТ может происходить при подпороговых уровнях $[Ca^{2+}]_i$ ниже 1 мкМ, что предполагает участие второго передатчика. Фармакологическая стимуляция протеинкиназы С 12-0-тетрадеканойл-форбол-13-ацетатом (ТФА) или синтетическим олеил-ацетилглицеролом (ОАГ) вызывает секрецию тромбоцитов, но реакция начинается позднее и протекает медленнее, чем при использовании тромбина или других стимулов. Если $[Ca^{2+}]_i$

повышается с помощью ионофоров от базального уровня (100 нМ) до 600 нМ (уровень слишком низкий для индукции секреции), а протеинкиназа С стимулируется ОАГ или ТФА, то начинается секреция, количественные и временные характеристики которой аналогичны наблюдаемым при секреции, индуцированной физиологическим стимулом, например тромбином. Поэтому вполне вероятно, что стимуляторы тромбоцитов (тромбин, ФАТ, а возможно, и АДФ) пробуждают тромбоциты к секреции посредством механизма передачи, в котором принимают участие как повышение $[Ca^{2+}]_i$, так и активация протеинкиназы С под действием ДАГ. Оба вторичных передатчика действуют синергично. На рис. 28 дана схема вторичных передатчиков, участвующих в сопряжении процесса передачи сигнала на эффектор.

Становится ясным, что для агрегации тромбоцитов необходимо участие кальция и ДАГ в качестве вторичных мессенджеров, однако это, по-видимому, не дает полной картины процесса. Например, при использовании АДФ для индукции секреции не возникает в присутствии ацетилсалициловой кислоты или в отсутствие фибриногена. Это наблюдение свидетельствует о том, что для проявления секреции, вызываемой АДФ, необходимы как агрегация, так и обмен арахидоната через циклооксигеназный путь. Действительно, судя по имеющимся данным, вызванная АДФ первичная агрегация необходима для начала образования ТА₂ в тромбоцитах. ТА₂ затем стимулирует тромбоциты через собственный рецептор, что облегчает образование ДАГ в результате гидролиза фосфоинозитидов. ДАГ действует синергично с повышением $[Ca^{2+}]_i$ вызванным АДФ, и эти два сигнала индуцируют секрецию (рис. 29).

Важное значение проведенных исследований заключается в следующем: а) установлено участие кальция и ДАГ как вторичных передатчиков; б) показана взаимосвязь различных реакций тромбоцитов. И природа вторичных передатчиков, и характер взаимосвязи реакций определяются типом лиганд-рецепторного взаимодействия, генерирующего реакцию.

Циклический АМФ

Как указывалось ранее, аденозин, ППЕ₂ и ППГ₂ вызывают в тромбоцитах повышение уровня цАМФ, что сопровождается подавлением ре-

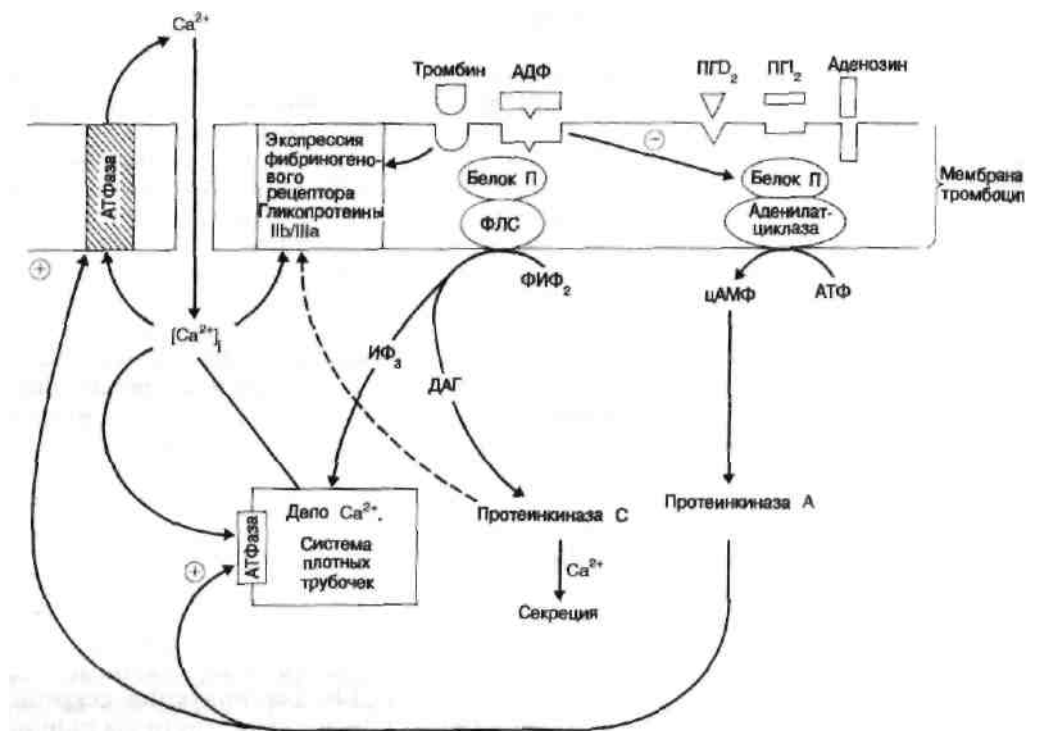


Рис. 28. Механизмы превращения сигнала в реакциях тромбоцитов.

Плюс-стимуляция; минус-подавление; ФЛС-фосфолипаза С; ФИФ₂- фосфатидилинозитол ИФ₃ - инозитол-1,4,5-трифосфат.

акций тромбоцитов. Предполагают, что цАМФ-зависимые протеинкиназы тромбоцитов активируют кальциевые АТФазы, которые «качают» кальций либо из тромбоцитов, либо в плотную тубулярную систему и другие внутриклеточные места хранения кальция (см. рис. 28). Кроме того, цАМФ-зависимые протеинкиназы ограничивают вход кальция в цитоплазму тромбоцитов или из внутритромбоцитарных депо, или из внутритромбоцитарной жидкости. Внутритромбоцитарный цАМФ может служить модулятором реакций тромбоцитов, которые вызываются кальцием (вторичным передатчиком). Возможно также, что цАМФ как таковой является вторичным передатчиком для превращения активации мембран в реакцию тромбоцитов; снижение внутритромбоцитарного цАМФ необходимо перед повышением уровня кальция в цитозоле для активации реакций. Выше уже излагались факты, свидетельствующие против этих положений. Тем не менее ПГЕ₁ и аденозин угнетают активацию, вызванную вазопрессинном (кото-

рый не подавляет аденилатциклазу), в большей степени, чем агрегацию, индуцированную АДФ (подавляет аденилатциклазу). Возможно определенный уровень внутритромбоцитарного цАМФ модулирует реакции тромбоцитов, однако его падение не служит вторичным передающим сигналом, соединяющим рецепторную активацию мембран и реакцию, поскольку оно не является необходимым для индукции реакции.

Тромбоциты и воспаление

Из предыдущих разделов главы понятно; что тромбоциты, как и тучные клетки или нейтрофилы, служат источником ряда веществ, которые могут опосредовать или регулировать воспалительные реакции. Более того, в местах воспаления обнаруживаются вещества, активирующие тромбоциты. Однако роль тромбоцитов в воспалении остается спорной; еще не накоплено достаточно данных, свидетельству-

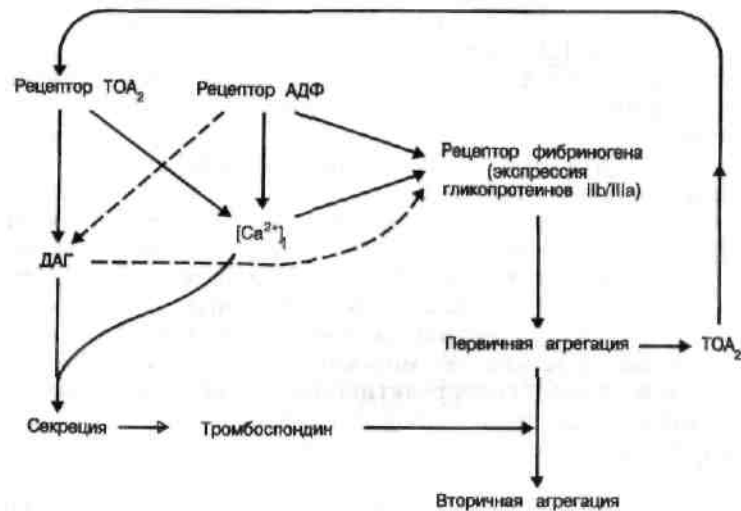


Рис. 29. Последовательность событий при опосредованных АДФ реакциях тромбоцитов [Hallam et al- In: Mechanisms of Stimulus- Response Coupling in Platelets/ Eds. J. Westwick, M. F. Scully, D.E. MacIntyre, V. V. Kakkar- New York: Plenum Press, 1985].

ющих о необходимости участия тромбоцитов в воспалении. Следует, однако, повторить, что, учитывая многокомпонентность воспаления, такие доказательства получить трудно.

Медиаторы тромбоцитов

Показано, что при различных типах воспаления тромбоциты агрегируют и выделяют содержимое своих гранул. Выделившиеся гистамин и 5-окситриптамин (в зависимости от вида) способны увеличивать сосудистую проницаемость, а ферменты, такие как катепсины, эластаза и коллагеназа, могут повреждать воспаленные ткани. Основные белки, также выделяемые тромбоцитами, усиливают местную сосудистую проницаемость. Показано, что антигениндуцированный бронхоспазм сопровождается выделением в циркуляцию некоторых маркеров активации тромбоцитов, например фактора 4 тромбоцитов.

Активация тромбоцитов сопровождается увеличением активности фосфолипазы А₂ и арахидоната, образуемого под действием этого фермента, что приводит к повышению уровня циклооксигеназных и липоксигеназных продуктов (см. главу 10). Показано, что тромбоциты, стимулированные в местах воспаления, образуют липоксигеназные вещества с хемотаксической активностью (ЛТВ₄) и циклооксигеназные продукты, способные модифицировать воспалительные реакции (см. главы 6,7, 10, 14). ПГЕ₂, например, усиливает воспалительные эффекты других медиаторов и из-

меняет реакции некоторых типов клеток, участвующих в воспалении. ПГЕ₂ вызывает продолжительную гипералгезию, способствующую усилению боли при воспалении. Таким образом, накопление тромбоцитов в местах воспаления и наличие в них медиаторов, обладающих провоспалительными свойствами, могут служить косвенным доказательством их участия в процессах воспаления.

Удаление тромбоцитов

Что же происходит с воспалительными реакциями при удалении тромбоцитов? Острые воспалительные реакции у крыс в этих условиях не изменяются. У тромбоцитопенических крыс развиваются нормальный карраге-ниновый отек лап и пассивная кожная анафилактическая реакция. Интересно, что анти-тромбоцитарная сыворотка вызывает воспалительные реакции у тромбоцитопенических крыс, причем картина воспаления не отличается от наблюдаемой у здоровых животных. Эффект антитромбоцитарной сыворотки связан с перекрестной реакцией с нетромбоцитарными антигенами. Приведенные данные показывают важность определения специфичности антисыворотки до получения окончательных результатов экспериментов с целевым использованием антисыворотки. В кожной пассивной анафилактической реакции, вызванной введением IgE-антител, не выявлено участия тромбоцитов в отличие от реакции, индуцированной преципитирующими антителами

(IgG), которая сопровождается агрегацией тромбоцитов. Преципитирующие антитела в отличие от IgE способны фиксировать комплемент, что, вероятно, и вызывает активацию при данном типе реакции пассивной кожной анафилаксии.

Антитромбоцитарная сыворотка вызывает спазм бронхов, что, вероятно, связано с тромбоцитами, поскольку у животных с низким уровнем тромбоцитов бронхоспазм не возникает. У кроликов анафилактический шок характеризуется наличием тромбоцитарных эмболов в легких, а гепарин оказывает некоторое защитное действие. У морских свинок ФАТ обуславливает гиперреактивность бронхов, которая аналогична наблюдаемой при бронхиальной астме у человека, причем данный эффект ФАТ зависит от тромбоцитов. Кроме того, у морских свинок ФАТ вызывает бронхоспазм, зависимый от тромбоцитов. В настоящее время установлено существование рецепторов к IgE на тромбоцитах, и, хотя они отличаются от аналогичных рецепторов тучных клеток (см. главу 2), их присутствие предполагает наличие механизма активации тромбоцитов при взаимодействии аллерген - IgE. Антиастматический препарат хромогликат подавляет в тромбоцитах IgE-зависимое генерирование свободных радикалов, которые являются важным медиатором гиперреактивности бронхов. ФАТ индуцирует гиперреактивность бронхов, что отличает его от других стимуляторов тромбоцитов; поэтому возможно, что данный эффект ФАТ не связан с тромбоцитами. Тромбоцитопения уменьшает эозинофильную инфильтрацию легких, которая обусловлена введением аллергена сенсibilизированным животным, что свидетельствует об участии эозинофилов в формировании гиперреактивности дыхательных путей. Однако до сих пор неизвестна степень участия тромбоцитов в развитии бронхиальной астмы у человека.

Тромбоциты при различных типах воспаления

По имеющимся данным, тромбоциты (у кроликов) не только способствуют некоторым острым воспалительным реакциям, но и принимают участие в реакциях замедленного типа, таких как реакция Артюса и сывороточная болезнь. Свидетельства их участия представлены в основном морфологическими данными, показывающими секрецию тромбоцитов в

местах реакции Артюса или в зонах поражения при сывороточной болезни. В этой связи важно отметить специфические характеристики кроликов, у которых тромбоциты содержат только гистамин, в отличие от тромбоцитов человека и крыс, содержащих 5-окситриптамиин. Кроме того, у кроликов отсутствуют IgE-анти-тела, поэтому активация тромбоцитов в реакциях повышенной чувствительности осуществляется преципитирующими антителами (IgG), которые, как уже указывалось, фиксируют комплемент. Тромбоцитопения сопровождается приступы астмы у человека; при этом обнаружены циркулирующие комплексы агрегатов тромбоцитов.

Эндотоксин, липополисахарид стенок грамотрицательных бактерий, вызывает агрегацию и секрецию у тромбоцитов. Кроме того, после инъекции эндотоксина тромбоциты в виде агрегатов накапливаются в микрососудах. Введение эндотоксина вызывает шок, а препараты, подавляющие реакции тромбоцитов, в некоторой степени защищают от шока. Введение второй дозы эндотоксина после примиряющей или сенсibilизирующей инъекции приводит к развитию состояния, напоминающего диссеминированную внутрисосудистую коагуляцию. Тромбоциты, таким образом, участвуют в воспалительных и других (сосудистых) реакциях на эндотоксин.

Тромбоциты, по-видимому, способны самостоятельно вызывать гибель бактерий и вирусов, а они в свою очередь могут индуцировать агрегацию и секрецию у тромбоцитов. Тромбоциты могут выделять бактерицидное вещество 0-лизин, а стимуляция тромбоцитов комплексом антиген - IgE приводит к высвобождению из тромбоцитов достаточно большого количества цитотоксических свободных радикалов, вызывающих гибель паразитов. Протеины, выделяющиеся из активированных таким образом тромбоцитов, могут повреждать и разрушать бактерии. Микроорганизмы могут захватываться тромбоцитами, но значение этого процесса не определено. Тромбоциты, поглотившие микроорганизмы, по-видимому, более быстро захватываются клетками ретикулоэндотелиальной системы, что, безусловно, ускоряет очищение циркуляции от вирусов и других микроорганизмов.

Клеточно-опосредованные иммунные реакции (например, реакция «трансплантат против хозяина») осуществляются с участием тромбоцитов. Тромбоцитарные тромбы являются характерным признаком в зоне отторжения

трансплантата. Значение этого факта опять-таки не определено; возможно, оно заключается в реакции на повреждение тканей, которое вызвано клетками и химическими медиаторами отторжения.

В заключение следует отметить, что тромбоциты во многих отношениях сходны с другими клетками, участвующими в воспалительных и иммунных реакциях. Они содержат (или могут синтезировать) мощные медиаторы воспаления и вовлекаются в такие реакции соответствующими стимулами. Тем не менее роль тромбоцитов в воспалительных реакциях до конца не выяснена, а представленные доказательства их участия в подобных реакциях в значительной мере приблизительны.

Список литературы

- Gordon J. L. fed.) (1981) Platelets in biology and pathology. In: Douglas J.T. & Gordon J. L. (eds) *Research Monographs in Cell and Tissue physiology*, vol 5. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Page C P. (1988) The involvement of platelets in nonthrombotic processes. *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 66-71.
- Roman A., Meyer F.A., Günter G. & Silberburge A. (eds) (1980) *Platelets: Cellular Response Mechanisms and their Biological Significance*. J. Wiley, New York.
- Willis A.L. (1979) Platelet aggregation mechanisms and their importance in haemostasis and inflammatory disease. In: Vane J. R. & Ferrerra S. H. (eds) *Inflammation and Antiinflammatory Drugs, Hefter's Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 50. Springer-Verlag, Berlin.
- Westwick J., Scully M.F., Macintyre D.E. & Kakkar V. F(eds) (1985) *Mechanisms of Stimulus- Response Coupling in Platelets*. Plenum Press, New York.

5 Эозинофильные лейкоциты

А. Б. Кей (А. В. Kay)

Введение

Список заболеваний и патологических состояний человека, которые сопровождаются увеличением количества эозинофилов в крови, тканях и секретах, достаточно велик. Приблизительно в нем можно выделить следующие группы: заболевания, сопровождаемые IgE-опосредованной повышенной чувствительностью (например, аллергическая бронхиальная астма, аллергические риниты и аллергические бронхолегочные аспергиллезы); инфекции, вызванные метазойными паразитами (в частности, гельминтами); некоторые медикаментозно обусловленные состояния; определенные заболевания соединительной ткани, а также злокачественные лимфопролиферативные и лимфопролиферативные болезни.

По многим характеристикам эозинофилы крови подобны нейтрофилам. Они представляют собой неделящиеся клетки, содержащие гранулы, которые образуются в костном мозге и имеют короткую продолжительность жизни в циркуляции. Эозинофилы, как и нейтрофилы, являются секреторными и фагоцитирующими клетками, их мембраны содержат рецепторы к иммуноглобулинам и компонентам комплемента. Широко распространено мнение о том, что эозинофилы специализированы для участия в защите организма от определенных паразитов так же, как нейтрофилы для разрушения и умерщвления различных бактерий. Хотя эта точка зрения не является общепринятой, в ее пользу имеются серьезные доказательства, полученные *in vitro*: личинки гельминтов, опсонизированные антителами и (или) комплементом, повреждаются преимущественно эозинофилами.

Образование и обновление

Об обмене эозинофилов имеется относительно мало информации. Большинство исследований, посвященных этой проблеме, проведено на крысах. Показано, что перед рождением

образование эозинофилов происходит в тимусе и лимфатических узлах. У взрослых животных большинство эозинофилов образуется в костном мозге, возможно, под влиянием факторов, выделяемых лимфоцитами.

Эозинофилы, нейтрофилы и, вероятно, базофилы развиваются из еще не идентифицированной клетки-предшественника. Прямым доказательством происхождения эозинофилов и нейтрофилов из единого предшественника служит наличие промиелоцитарной лейкемической клеточной линии HL-60, которая в зависимости от условий культивирования дифференцируется либо в нейтрофилы, либо в эозинофилы.

Предшественники эозинофилов в костном мозге, как и метамиелоциты и сегментоядерные формы, легко распознаются. Подобно предшественникам других гранулоцитов, они проходят несколько делений перед созреванием и выходом в кровеносное русло. Период их созревания в костном мозге составляет от 2 до 6 дней, а время полураспада в циркуляции — 6-12 ч. На основании данных, полученных *in vitro*, предполагается, что созревание эозинофилов происходит в основном под контролем колониестимулирующего фактора (КСФ-а). Очищенный КСФ-а облегчает рост эозинофильных колоний и усиливает цитотоксичность эозинофилов. У эозинофильных метамиелоцитов отмечается очень высокий белковый синтез, что следует из наличия в них развитого эндоплазматического ретикулума и нескольких (до четырех) ядрышек. При созревании и появлении гранул морфологические признаки белкового синтеза исчезают. Эозинофилы обычно относят к клеткам конечной стадии созревания, хотя в тканях изредка обнаруживаются и эозинофилы на стадии митоза. *In vitro* клетки могут оставаться жизнеспособными в течение нескольких дней.

На каждый циркулирующий эозинофил приходится примерно 200 зрелых клеток в костном мозге и 500- в рыхлой подслизистой соединительной ткани. Между образованием

эозинофилов в костном мозге и транспортировкой их кровью в определенные ткани сохраняется динамический обмен. Полностью судьба клеток не определена, хотя интактные или поврежденные эозинофилы могут поглощаться макрофагами или экскретироваться через слизистые оболочки кишечника и дыхательных путей. Существует определенное сходство с элиминацией нейтрофилов, часть из которых экскретировается в интактном или поврежденном виде с калом и секретами дыхательных путей, а остальные удаляются тканевыми макрофагами.

Структура эозинофилов

Морфология

У всех видов животных эозинофилы характеризуются наличием больших внутрицитоплазматических гранул. Человеческие эозинофилы диаметром примерно 10-15 мкм содержат около 200 гранул, которые окрашиваются кислыми анилиновыми красителями (эозин или хромотроп 2R) в желто-розовый цвет. Форма гранул сферическая или яйцеобразная, диаметр гранул составляет примерно 0,5-1 мкм. Как показывают ультраструктурные исследования, гранулы содержат кристаллическое ядро (или «внутренность»), окруженное мат-риксом из двухслойных мембран, имеющих меньшую электронную плотность. Гранулы содержат ряд уникальных для эозинофилов белков, хотя некоторые другие ферменты также присутствуют в нейтрофилах и базофилах. Главными отличительными признаками гранул эозинофилов (в сравнении с другими клетками) являются высокое содержание биохимически различимой пероксидазы и присутствие по крайней мере трех других основных белков.

Кроме больших кристаллоидов, зрелые эозинофилы содержат более мелкие гранулы, в которых отсутствует кристаллическое ядро, и окрашиваются более интенсивно при воздействии кислой фосфатазы и арилсульфатазы. Мелкие гранулы, по-видимому, являются производными аппарата Гольджи.

По своим характеристикам ядра эозинофилов напоминают ядра других зрелых гранулоцитов и включают в себя участки конденсированного хроматина, расположенного вдоль ядерной мембраны, с нитевидными связями между долями ядра. Ядрышки (место

синтеза рибосомных РНК) в зрелых клетках отсутствуют, что свидетельствует о прекращении в них основных биосинтетических процессов.

В эозинофилах выявляются митохондрии, аппарат Гольджи, рибосомы и эндоплазматическая сеть. Многие из этих внутриклеточных органелл присутствуют в большем числе и развиты лучше, чем в нейтрофилах. При сканирующей электронной микроскопии мембрана эозинофила не отличается от мембраны нейтрофилов и представлена поверхностными нитями, складками и бороздами.

Главный основной белок

Кристаллоидное ядро эозинофилов почти полностью состоит из главного основного белка (ГОБ), обогащенного аргинином. ГОБ человека и морских свинок был получен в высокоочищенном виде при изоляции гранул с последующей элюцией разбавленными кислотами. Молекулярная масса человеческого ГОБ составляет 9200-11 000, а изоэлектрическая точка-свыше 10. *In vitro* ГОБ убивает шистосомулы *S. mansoni* и другие личинки гельминтов. Не исключено, что это является важным механизмом, вызывающим гибель личинок *in vivo*. ГОБ может также действовать, как лиганд, облегчающий адгезию эозинофилов к поверхности личинок паразитов. ГОБ обнаружен в человеческих базофилах, что расценивается как доказательство общего происхождения этих двух типов клеток.

Основной белок эозинофилов

В гранулах эозинофилов человека идентифицирован и другой белок с высоким содержанием аргинина. Этот основной белок эозинофилов (ОБЭ) иммунохимически отличается от ГОБ; его молекулярная масса составляет 17 000. Существует ряд особенностей, связанных с ОБЭ и включающих изменения коагуляции и некоторые Т-клеточные реакции. Подобно ГОБ, ОБЭ вызывает повреждение шис-тосомул *S. mansoni in vitro*, причем в экви-молярной концентрации он обладает большей активностью. Получены моноклональные антитела к секреторной и внутриклеточной формам ОБЭ, которые позволяют идентифицировать секреторные продукты гранул в тканях.

Пероксидаза

Матрикс (или кора), окружающий ядро эозинофильной гранулы, содержит большое количество пероксидазы, нечувствительной к цианиду; она отличается от миелопероксидазы нейтрофилов как биохимически, так и по антигенным свойствам. Показано, что пероксидаза выделяется в фагосомы (после фагоцитоза) и на поверхность червей гельминтов (после адгезии эозинофилов).

Пероксидаза эозинофилов в присутствии H_2O_2 и хлорида вызывает нецитотоксическую дегрануляцию тучных клеток. Точное значение этого эффекта *in vivo* неизвестно, но, вероятно, он может быть важным усиливающим механизмом выделения фармакологических медиаторов повышенной чувствительности.

Сообщалось о генетическом дефиците пероксидазы эозинофилов, который, по-видимому, передается аутомно-рецессивным способом; данный дефект описан в двух семьях на Ближнем Востоке. Эозинофилы при этом имеют гиперсегментированные ядра и дают негативное окрашивание на пероксидазу и нормальное окрашивание на основные белки и кислые фосфатазы. Обследованные лица с этим дефектом, видимо, клинически здоровы.

Эозинофильный нейротоксин

В гранулах эозинофилов содержится четвертый основной белок - эозинофильный нейротоксин (ЭНТ), имеющий молекулярную массу примерно 18 000. У экспериментальных животных ЭНТ вызывает повреждение клеток Пуркинье и миелинизированных нейронов (феномен Гордона). Биологическое или патологическое значение ЭНТ неизвестно, хотя наличие ЭНТ позволяет объяснить неврологические нарушения при гиперэозинофильном синдроме и некоторых паразитарных инфекциях.

Кристаллический белок Шарко- Лейдена

Кристаллы Шарко-Лейдена (КШЛ) представляют собой удлиненные гексагонально-бипирамидальные кристаллы, которые были обнаружены более 100 лет назад; их появление связывают с повышенным содержанием эозинофилов в периферической крови или тканях у людей. Например, наличие КШЛ в мокроте больных бронхиальной астмой свидетельствует об эозинофильной реакции. В настоящее время известно, что КШЛ состоят из чистого

мембранного белка с молекулярной массой примерно 13 000. Показано, что этот белок является лизофосфолипазой (фосфолипаза В) и играет важную роль в инактивации других токсических лизофосфолипидов. Позднее было установлено, что источником КШЛ могут быть и базофилы. Таким образом, обнаружение этих кристаллов может служить указанием на участие в воспалительной инфильтрации более широкого спектра клеток, чем предполагалось первоначально.

Другие грануласоциированные ферменты

Помимо основных белков в гранулах эозинофилов содержится ряд других гидролитических и протеолитических ферментов, в том числе арилсульфатаза В (тип II), фосфолипаза D (ранее ее присутствие связывалось только с растительными тканями), гистаминаза, кислая фосфатаза, Р-глюкуронидаза, кислая Р-глицерофосфатаза, рибонуклеаза и катепсин.

Рецепторы клеточной поверхности

Иммуноглобулиновые рецепторы

На поверхности плазматической мембраны эозинофилов обнаруживается ряд «распознающих единиц»-рецепторы для IgE(Fc) и IgG(Fc). Fc-у-рецепторы на человеческих эозинофилах и нейтрофилах имеют структурные различия. Например, у эозинофилов Fc-у является 43RD макромолекулой, тогда как солубилизованный нейтрофильный рецептор имеет от 52 до 68 RD, как и рецептор 33RD. Эти белки различаются и по специфичности к IgG3. На нейтрофилах молекула 33RD, по-видимому, является производной 43 RD Fc-у эозинофильного рецептора.

На человеческих и крысиных эозинофилах были идентифицированы низкоаффинные Fc-рецепторы для IgE (Fc-е R2). Для идентификации использовался метод розеткообразования эритроцитов, ковалентно связанных с белком IgE миеломы, а также метод связывания радиолиганда с использованием человеческого IgE, меченного ^{125}I . Моноклональные антитела (ВВЮ) распознают Fc-е R2 на поверхности эозинофилов, моноцитов и тромбоцитов. Экспрессия Fc-е-рецепторов увеличивается на эозинофилах пониженной плотности (активированных), полученных у больных с гиперэозинофилией. По антигенному составу

Fc-ε-рецепторы обладают сходством с низкоаффинными рецепторами лимфоцитов и моноцитов. Функциональная роль IgE-рецепторов определяется их участием в опосредованной эозинофилами гибели шистосомул *S. mansoni* у человека и крыс. Прямые доказательства участия IgE в этом процессе получены при использовании моноклонального IgE, направленного против гаптенизированных личинок шистосомул.

Особо интересная характеристика IgE-рецепторов эозинофилов-их «окупированность». У тканевых эозинофилов (клеток, полученных при легочном лаваже) IgE-рецепторы в отличие от IgG-рецепторов заняты цитотфильными IgE. Степень занятости IgE-рецепторов определяется концентрацией IgE в сыворотке.

Небольшая часть эозинофилов также связывает эритроциты быка, покрытые IgM. Присутствие «криптических» IgM-рецепторов, возможно, свойственно зрелым эозинофилам.

После инкубации с факторами хемотаксиса у эозинофилов повышается способность к образованию розеток с эритроцитами (Э), покрытыми кроличьими анти-Э, или с человеческими миеломными IgG различных подклассов, например Э-IgG1, 3-IgG2, 3-IgG3 и 3-IgG4. Обусловлен ли этот процесс увеличением числа рецепторов или же он является результатом повышения аффинитета эозинофильной мембраны к многовалентным частицам, пока неясно. Однако феномен увеличения количества рецепторов может иметь значение в патологии и представлять собой признак усиления воспалительной реакции.

Комплемент

С помощью метода розеткообразования показана способность эозинофилов к связыванию Э-СЗБ и Э-СЗЫ. Эти данные были недавно подтверждены при использовании антител против рецепторов к комплементу (CR)1 и CR3. Эозинофилы человека также связывают меченый СЗа, но не СЗа des arg. Установлено, что СЗа связывается преимущественно с эозинофилами, а не с нейтрофилами. Кроме того, человеческие эозинофилы реагируют на С5а хемотаксисом, но сведений о рецепторных исследованиях пока нет.

Вещества мембранного происхождения

В ряде исследований показано, что после стимуляции кальциевыми ионофорами эозинофи-

лы человека образуют преимущественно МДВ-А, сульфопептидные лейкотриены (ЛТС₄, ЛТД₄, ЛТЕ₄). Напротив, нейтрофилы образуют ЛТВ₄ с почти неопределимыми количествами МДВ-А. Недавно было показано, что физиологические стимулы (частицы, покрытые IgG) также побуждают эозинофилы к образованию МДВ-А (лейкотриенов), причем большее их количество генерируется «активированными» клетками (т.е. эозинофилами, предварительно стимулированными *in vitro* хемотаксическими факторами или же клетками низкой плотности; см. ниже). Кроме того, при стимуляции ионофором эозинофилы образуют значительные количества ФАТ.

При инкубации эозинофилов, стимулированных ионофором, с меченной радиоактивными изотопами экзогенной арахидоновой кислотой было выявлено преимущественное образование производных обмена 15-липоксигеназы.

Активированные эозинофилы

В течение некоторого времени считали, что эозинофилы в крови больных с эозинофилией более активны, чем нормальные эозинофилы. Рядом исследователей было показано, что эозинофилы являются гетерогенной популяцией по характеристикам плотности при центрифугировании в градиенте Перколла или метризамида. В непрерывном градиенте метризамида клетки разделяются на легкие (пониженная плотность) и нормальные (нормальная плотность) фракции.

По сравнению с клетками нормальной плотности «легкие клетки» от одного и того же донора обладают повышенной экспрессией мембранных рецепторов к Fc-γ и Fc-ε, более высокой цитотоксичностью к личинкам гельминтов *in vitro*, продуцируют большее количество ЛТС₄ после инкубации с покрытыми IgG частицами, метаболически более активны и обнаруживают полную или частичную потерю кристаллического ядра гранул (что, вероятно, соответствует «вакуолизированным клеткам», выявляемым в периферической крови при гиперэозинофильном синдроме). С другой стороны, эозинофилы нормальной плотности у больных с увеличенным количеством эозинофилов в крови обладают значительно более высокой цитотоксичностью в отношении к шистосомулам по сравнению с эозинофилами нормальной плотности у здоровых лю-

дей. Кроме того, остается спорным вопрос о принадлежности эозинофилов пониженной плотности к активированным клеткам (вследствие патологического процесса) или к клеткам, находящимся в определенной стадии зрелости. Оседлые эозинофилы (например, полученные из легких при легочной эозинофилии) относятся к «легкому» типу клетки. Недавние исследования с использованием моноклональных антител к гранулоцитарным мембранам выявили изменение количества антигенных детерминант на активированных эозинофилах.

Эозинофилы при гельминтных инфекциях

Общеизвестна связь между эозинофилами и гельминтными инфекциями. Точно установить причину данной связи (т. е. определить, первичная, вторичная или последующая инфекция) весьма трудно ввиду чрезвычайной сложности определения жизненных циклов этих паразитов, а также иммунного статуса хозяина в момент наблюдения.

Несмотря на трудности точной оценки роли эозинофилов в развитии гельминтной инфекции, некоторые обобщения все же можно сделать. У сенсibilизированных, примированных животных интенсивная эозинофилия обычно наблюдается при миграции личинок в ткани. По мере того как инфекция приобретает хронический характер, присутствие эозинофилов становится все менее выраженным. Однако это не является абсолютным правилом, поскольку при шистосомозе, например, эозинофилы часто обнаруживаются (и в немалых количествах) в гранулемах вокруг яиц.

В иммунной реакции на червей участвуют иммуноглобулины разных классов, в том числе IgE. Значительное возрастание уровня IgE характерно для тропической эозинофилии, и большинство гельминтных инфекций сопровождается стабильной IgE-реакцией. В эксперименте на крысах показана прямая связь между IgE-антительным ответом и устойчивостью к инфекции: избирательное подавление продукции IgE снижает как резистентность, так и эозинофильную реакцию на инфекцию, вызванную *Trichinella spiralis*. В этом смысле хозяин становится «аллергичным» к паразиту, что показано, например, при легочном аскаридозе, сопровождающемся интенсивной астматической реакцией. Интенсивный зуд сопровождается кожную фазу повторной глистной ин-

фекции. При стронгилоидозе и филяриатозе мигрирующие личинки вступают в контакт с тучными клетками, сенсibilизированными IgE, специфичным к паразитам, причем личинки могут быть опсонизированы антителами (IgG) и комплементом. Показано, что шисто-сомула и другие личинки гельминтов могут активировать комплемент по альтернативному пути, а тучные клетки адгезируют к личинкам, покрытым комплементом.

Некоторые вещества, выделяемые тучными клетками, являются хемотаксическими факторами для эозинофилов. К ним относятся гистамин, ЭХФ-А пептиды (эозинофильный хемотаксический фактор анафилаксии) и ряд липидных медиаторов, производных арахидоновой кислоты. Опосредованное IgE выделение этих веществ, которое происходит в результате контакта со специфическими (в отношении стадии) поверхностными антигенами мигрирующего паразита, приводит к вовлечению и инфильтрации клеток воспаления, а также к прямому контакту эозинофилов и базофилов с поверхностью личинок. При повторном инфицировании крыс нематодами *Strongyloides ratti* показано увеличение числа эозинофилов во время кишечной, легочной и кожной стадий инфекции, которое коррелирует с количеством личинок в легких и коже. Интересно, что у гипериммунных крыс чрескожное введение экстракта антигена *Strongyloides* вызывает реакцию повышенной чувствительности немедленного типа, которая сопровождается быстрой (1-3 ч) и значительной эозинофильной инфильтрацией и гибелью большинства личинок. Гистологически выявляется тесный контакт эозинофилов с кутикулярной поверхностью фрагментов мертвых личинок. Эти данные свидетельствуют в пользу предположения об активации эозинофилов у животных с иммунитетом, которая приводит к повреждению и(или) гибели мигрирующих личинок *in vivo*. В то же время аналогичные наблюдения отмечаются при I типе реакции аллергической гиперсеиситивности.

Особый интерес представляет специальная роль эозинофилов как цитотоксических клеток в реакциях, зависимых от антител и(или) комплемента, которые вызывают гибель личинок паразитов *in vitro*. Первоначально было показано, что эозинофилы человека являются главными эффекторными клетками в антитело (IgG)-3acHCHMOM повреждении шистосомул *S. mansoni in vitro*. Позже (у крыс) обнаружили, что шистосомулы, покрытые C3 при альтерна-

тивном пути активации, высокочувствительным к повреждениям, опосредованным эозинофилами. Затем было показано, что человеческие эозинофилы и нейтрофилы убивают шистосомул, покрытых антителами и(или) комплементом, но эозинофилы как цитотоксические клетки более эффективны в присутствии комплемента (одного или в комбинации с антителами). Аналогичные результаты получены на модели филяриатоза *in vitro*. Вопрос об эффективности нейтрофилов в таких системах *in vitro* остается спорным. Некоторые исследователи предполагают наличие у нейтрофилов лишь очень слабой активности либо полное ее отсутствие, тогда как другие считают, что цитотоксический потенциал нейтрофилов и эозинофилов одинаков. Например, человеческие эозинофилы и нейтрофилы одинаково эффективно вызывают гибель новых личинок *Trichinella spiralis*.

Однако данные ряда исследований *in vivo* позволяют поддерживать точку зрения об эозинофиле как главной цитотоксической клетке в отношении личинок паразитов. Так, адаптивный перенос перитонеальных эозинофилов от крыс с иммунитетом интактным животным вызывает у последних высокую устойчивость к инфекции *S. mansoni*.

Активация эозинофилов веществами различного происхождения приводит к ускорению гибели личинок и яиц паразитов. Тучные клетки и их медиаторы (гистамин, ЭХФ-А, тетрапептиды и лейкотриен B_4) способствуют IgG-, IgE- и комплементзависимой гибели шистосомул. На клетках человека показано, что базофилы крови ускоряют гибель шистосомул, которая вызывается эозинофилами по типу извращенной (IgE-опосредованной) анафилаксии. Подобная система с вовлечением тучных клеток, активированных aНТН-IgG2a или анти-IgE, была ранее описана у крыс. Аналогично этому, супернатанты культур мононуклеарных клеток (СКМК) ускоряют вызванную эозинофилами гибель в антителозависимой системе. Интересно отметить, что активными являются СКМК от больных с эозинофилией, а не от здоровых людей. На основании предварительных результатов исследований предполагается макрофагальное происхождение активности СКМК. Показано также, что антитело- и комплементзависимая цитотоксичность усиливается колониестимулирующим(и) фактором(ами). Эти исследования активации эозинофилов *in vitro* показывают, что клетки могут быть примированы для более эффективного

уничтожения паразитов как на стадии предшественника (стадия развития в костном мозге), так и с помощью продуктов тучных клеток, которые регулируют миграцию эозинофилов в тканях.

Таким образом, многие наблюдения свидетельствуют в пользу точки зрения о роли медиаторов гиперсенситивности в иммунитете к гельминтам, причем медиаторы рекрутируют и активируют цитотоксические эффекторные клетки, главным образом эозинофилы. Совсем недавние исследования показали участие лейкотриенов в иммунной реакции (у крыс) на повторное введение *Nippostrongylus brasiliensis* и *Trichinella spiralis*. В этом эксперименте установлена связь между высокими концентрациями кишечных и внекишечных лейкотриенов (особенно LTC₄/D₄) и увеличением количества эозинофилов и слизистых тучных клеток в тканях животных с иммунитетом.

Механизмы гибели личинок гельминтов под действием эозинофилов пока точно не определены. Как уже отмечалось, основные белки, такие как ГОБ и ОБЭ, обладают подобной активностью *in vitro*. Получены противоречивые данные о роли окислительных процессов, особенно с участием частично восстановленных продуктов кислорода и пероксидазы эозинофилов.

Эозинофилы при аллергии

К аллергическим заболеваниям, сопровождающимся эозинофилией, как правило, относят состояния, при которых доминируют реакции гиперсенситивности немедленного типа, т. е. реакции, вовлекающие сенсibilизированные IgE тучные клетки, запускаемые специфическим аллергеном. Они включают сенную лихорадку и другие формы аллергического ринита, аллергическую бронхиальную астму и анафилактические реакции у лиц, чувствительных к некоторым лекарственным препаратам и укусам насекомыми.

Выше были представлены данные, свидетельствующие в пользу выделения активных факторов при взаимодействии со специфическим антигеном сенсibilизированных тучных или других клеток, несущих Fc-ε-рецепторы (макрофаги и Т-клетки). Эти факторы являются хемотаксинами эозинофилов, поэтому эозинофилы мигрируют посредством хемотаксиса или хемокинеза к месту дегрануляции тучных клеток. Роль эозинофилов, достигших места

реакции повышенной чувствительности немедленного типа, является предметом множества гипотез. Предполагается, что эозинофилы в этой ситуации обладают дополнительной регуляторной функцией, понижая активность тучных клеток. В пользу такого предположения свидетельствует наличие гистаминазы в эозинофилах, хотя существует множество не-эозинофильных источников этого фермента. Недавно была показана инактивация ЛТВ₄, LTC₄ и LTD₄ пероксидазой эозинофилов в реакциях, зависящих от H₂O₂ и хлорида. Кристаллические белки Шарко-Лейдена также могут играть определенную роль в регуляции тучных клеток, поскольку лизофосфолипазы инактивируют потенциально токсичные фосфолипиды, образованные под действием фосфолипазы A₂. Эти наблюдения иногда используются в качестве доказательства участия эозинофилов в негативной регуляции аллергических реакций, опосредованных тучными клетками. Предполагают, что повышенная чувствительность немедленного типа, опосредованная IgE, сохраняется в филогенезе благодаря преимуществам этого механизма в формировании приобретенного иммунитета к метазойным инфекциям. В эволюционном смысле польза взаимодействия тучные клетки-IgE-эозинофил для ограничения гель-минтных инфекций значительно перевешивает его побочный эффект в виде достаточно тривиальных заболеваний, таких как аллергический ринит. Это объясняется тем, что гельминты и основные аллергены стимулируют сравнимые иммунные механизмы, возможно, благодаря наличию перекрестных антигенов или же в результате аналогичного действия на одни и те же иммунекомпетентные клетки. Таким образом, «аллергия» и сопровождающая ее эозинофилия могут быть ошибкой идентификации (т. е. организм реагирует на аллерген как на паразитов). А поскольку гельминтные инфекции представляют собой некоторые формы эволюционного отбора, эозинофилы, тучные клетки и IgE сохраняются.

Повреждения тканей вследствие действия эозинофилов и их факторов

Очевидно, что эозинофилы вместе с продуктами, содержащимися в их гранулах и связанными с их мембранами, обладают значительным потенциалом в отношении повреждения тканей. ГОБ является токсическим фактором

для различных клеток организма, в том числе для асцитных опухолевых клеток, мононуклеарных фагоцитов и реснитчатых эпителиальных клеток дыхательных путей. LTC₄, главный продукт 5-липоксигеназы патофизиологически стимулированных эозинофилов, может внести существенный вклад в сокращение гладких мышц и гиперсекрецию слизи.

В настоящее время представлены значительные данные в пользу критической роли эозинофилов в патогенезе бронхиальной астмы. Количество эозинофилов в крови соотносится со степенью нарушения проходимости бронхов, а между количеством эозинофилов и степенью неспецифической гиперреактивности бронхов выявляется обратная корреляция. Существует также связь между клиническим улучшением вследствие применения препарата, стабилизирующего тучные клетки (двунариевый хромогликат, ДНХГ), и процентом эозинофилов в трахеобронхиальных секретах и образцах, получаемых при лаваже легких. Определенное количество эозинофилов и ОБЭ присутствует в лаважной жидкости из бронхов у больных с двойной (ранней и поздней) реакцией после введения разрешающей дозы антигена, чего не наблюдается у больных, реагирующих на антиген только ранней фазой. Увеличение содержания эозинофилов в крови больных отмечается в течение поздней фазы астматической реакции и не выявляется в раннюю фазу.

Предполагается, что ГОБ играет особую роль в повреждении тканей, поскольку он определяется в слизистых пробках, на поврежденных эпителиальных поверхностях и под базальной мембраной в аутопсийных материалах бронхов, полученных от умерших вследствие бронхиальной астмы. ГОБ легко связывается с сывороточными белками и, возможно, с мембранами клеток через свои две дисульфидные связи. Белок также легко полимеризуется, поэтому в экспериментальных моделях используется его восстановленная и алкилированная форма. Однако и нативные формы ГОБ и ОБЭ обладают цитотоксичностью и могут стимулировать выделение гистамина из базофилов человека.

При менее распространенных легочных заболеваниях, например при криптогенном фиброзном альвеолите, обнаружение эозинофилов в лаважной жидкости из бронхов часто является плохим прогностическим признаком. Эозинофилы, выделенные из бронхоальвеолярного смыва при интерстициальном легоч-

ном заболевании людей, обладают спонтанной цитотоксичностью в отношении легочного эпителия кошек, что указывает на возможную роль эозинофилов в хронических воспалительных заболеваниях нижних дыхательных путей.

Растет интерес к роли эозинофилов и особенно к ферментам их гранул при эозинофильной эндокардиальной болезни, а также при кардиомиопатии, часто сопровождающейся гиперэозинофильным синдромом.

Резюме

Широкий спектр заболеваний и клинических состояний сопровождается эозинофилией. Среди них гиперсенсиitivность немедленного типа (опосредованная тучными клетками) и глистные инфекции. По биологическим характеристикам эозинофилы во многом напоминают нейтрофилы; однако между ними существуют и определенные различия. Эозинофилы отличаются от нейтрофилов по содержанию больших кристаллоидных гранул, в которых находятся уникальные основные белки, а также по своей способности к преимущественному образованию сульфидопептидных лейкотриенов и МДВ-А. Вещества, образуемые эозинофилами, вероятно, играют важную роль в разрушении личинок гельминтов, но вместе с тем при некоторых состояниях, например при хронической бронхиальной астме и гиперэозинофильном синдроме, они ответственны за значительные повреждения тканей организма. Роль эозинофилов при аллергических заболеваниях, опосредованных IgE, определена не

полностью. Приведены убедительные доказательства их участия в подавлении аллергической реакции. С другой стороны, эозинофилы могут быть неадекватно вовлечены в аллергическое заболевание вследствие филогенетически обусловленной неспособности различать аллергены и глисты.

В настоящее время отмечается растущий интерес к популяции эозинофилов низкой плотности-активированных клеток, которые выявляются при многих состояниях, сопровождаемых эозинофилией. В ряде биологических систем эти «легкие клетки» реагируют значительно активнее эозинофилов нормальной плотности. Определен ряд веществ, избирательно активирующих эозинофилы. Природа этих веществ весьма разнообразна; среди них можно отметить факторы, связанные с созревaniem эозинофилов, различные продукты тучных клеток, а также вещества, выделяющиеся из тканей при воспалительных и аллергических реакциях.

Знания об эозинофилах и событиях, в которых они участвуют, быстро возрастают, что влечет за собой постоянные изменения наших представлений о точной роли эозинофилов в свете новых данных.

Список литературы

- Capron M. & Capron A. (1987) The IgE receptor on human eosinophils. In: Kay A. B. (ed.) *Allergy and Inflammation*. Academic Press, London. Gleich G. J. The eosinophilic leukocyte: structure and function. In: *Progress in Immunology*. Academic Press, London (in press). Kay A.B. (1985) Eosinophils as effector cells in immunity and hypersensitivity disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 62, 1-12.

6 Мононуклеарные фагоциты

П. Девис (P. Davies)

Введение

Поддержание целостности организма критически зависит от удаления из него экзогенных патогенов, а также ослабленных клеток и измененного межклеточного вещества соединительной ткани. Для этого необходима активность «профессиональных» фагоцитов, а именно: полиморфно-ядерных лейкоцитов и мононуклеарных фагоцитов. Способность ПМЯЛ проникать в различные части организма и защищать его от патогенов рассматривается в главе 3. Достаточно повторить, что большое количество ПМЯЛ быстро накапливается в местах травмы или инфекции, направляя против патогенов мощные биоцидные механизмы и разрушая их фагоцитозом. Нарушение функции ПМЯЛ может привести к быстрому и обширному повреждению тканей в результате острого воспаления. К основным факторам ПМЯЛ, принимающим участие в воспалении, относятся уникальные нейтральные протеазы, эластазы и катепсин G (см. главу 3), а также метаболиты кислорода, образуемые в значительных количествах во время взрыва метаболической активности клеток при распознавании и фагоцитозе стимулов воспаления.

Роль мононуклеарных фагоцитов в защите организма дополняет ПМЯЛ. Они также в больших количествах накапливаются в местах воспаления, но значительно медленнее, чем ПМЯЛ. Здесь они отвечают на воспалительные и патогенные стимулы с помощью специализированных цитотоксических и фагоцитарных механизмов. Мононуклеарные фагоциты способствуют удалению поврежденных клеток и соединительной ткани, обеспечивая начало репаративных процессов. Мононуклеарные фагоциты дифференцируются в очагах воспаления и секретируют большое количество веществ, оказывающих многостороннее влияние на процессы воспаления, а также на клетки и компоненты соединительной ткани в ближайшем окружении. Когда воспаление оказывается резистентным или рецидивирует, мононуклеарные фагоциты рекрутируют дополни-

тельные ПМЯЛ и клетки собственной линии. В этих условиях появляются признаки хронического воспаления: разрушение тканей и локальная пролиферация клеток и соединительной ткани. Взаимодействие мононуклеарных фагоцитов с иммуногенными воспалительными стимулами также приводит к примириванию иммунной системы. Это происходит при генетически рестриктированном представлении иммуногена Т-лимфоцитам определенными популяциями мононуклеарных фагоцитов совместно с продуктами главного комплекса гистосовместимости, что приводит к пролиферации Т-лимфоцитов и развитию клеточно-опосредованных иммунных реакций. Взаимодействие мононуклеарных фагоцитов с Т-лимфоцитами также ведет к рекрутированию В-лимфоцитов, синтезу специфических антител и проявлению гуморального иммунитета.

Кроме мононуклеарных фагоцитов, мобилизуемых в места воспаления, в разных органах и тканях существуют и стабильные популяции этих клеток, которые удаляют ослабленные клетки и циркулирующие патогены и поддерживают целостность тканей с помощью определенных механизмов (см. ниже).

Происхождение и жизненный цикл мононуклеарных фагоцитов

Перед обсуждением происхождения и жизненного цикла мононуклеарных фагоцитов необходимо остановиться на их номенклатуре. Мононуклеарный фагоцит-это собирательное название клеток данной линии, которые происходят из стволовой клетки костного мозга и находятся на разных стадиях своего жизненного цикла. Мононуклеарные клетки костного мозга распознаются морфологически (рис. 30), их зрелые формы известны как моноциты. Далее клетки выходят из костного мозга в кровотоки. Покидая кровотоки, моноциты расселяются по всему организму, превращаясь во многие дифференцированные формы, для обо-

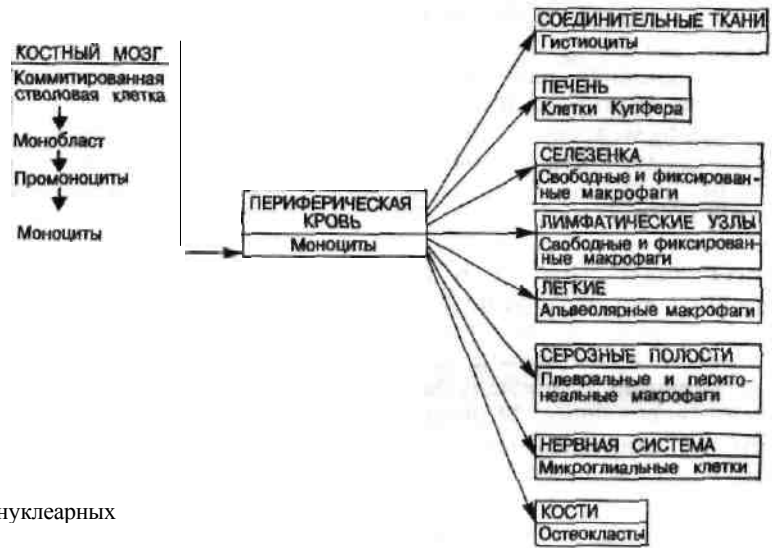


Рис. 30. Происхождение и распределение мононуклеарных фагоцитов.

значения которых используют разные наименования наряду с общим термином «макрофаг».

Хотя мононуклеарные фагоциты рассеяны по различным органам, тканям и серозным полостям организма, они имеют общее происхождение из полипотентной стволовой клетки костного мозга. Предполагается, что из этой стволовой клетки формируются предшественники всех гемопоэтических клеток, а именно эритроцитов, лимфоцитов, ПМЯЛ и мононуклеарных фагоцитов. Дифференциация на различные клеточные типы зависит от серии ростовых факторов, известных как колониестимулирующие факторы.

Доказательства происхождения мононуклеарных фагоцитов из костномозгового предшественника получены в серии исследований с использованием животных-химер. Химеры образуются при рентгеновском облучении экспериментальных животных, которое разрушает все стволовые клетки мононуклеарных фагоцитов. Затем осуществляется пересадка костного мозга, содержащего стволовые клетки другого животного. Пересаживаемые клетки костного мозга метят радиоактивным тимином или (альтернативно) получают их от животных, обладающих характерным хромосомным маркером, который легко идентифицируется у облученного реципиента. В костном мозге стволовая клетка, коммитированная к дифференциации в мононуклеарный фагоцит, вызревает в морфологически различные типы

ны

клеток: монобласты и промоноциты. Промоноциты при делении образуют моноциты, которые последовательно выходят в кровотоки, где циркулируют в течение 1-3 дней перед миграцией в различные внесосудистые отсеки (компарменты). После вхождения в кровотоки моноциты в норме прекращают деление, а их миграция в разные ткани и органы отмечена глубокой морфологической дифференциацией, характерной для места их окончательного расположения.

Как видно на рис. 30, мононуклеарные фагоциты широко распространены в организме. Современные расчеты показывают, что наибольшее их количество (более половины) находится в печени, где их называют клетками Купфера. Недавно эти клетки были выделены; их функции изучались в условиях тканевой культуры, что позволило установить их характерные свойства, близкие мононуклеарным фагоцитам.

Выделяют несколько признаков, определяющих дифференциацию зрелого мононуклеарного фагоцита. Зрелые клетки увеличиваются в размерах, у них появляется большое количество вторичных лизосом, активный эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи, что указывает на усиление биосинтетической и секреторной активности. Кроме того, изменения в мононуклеарных фагоцитах определяются местом их расположения. Например, в легких в соответствии с микроокружением в мононуклеарных фагоцитах значитель-

но усиливается окислительная метаболическая активность.

В условиях равновесия выход моноцитов в циркуляцию остается постоянным и относительно медленным процессом. Период полураспада мононуклеарных фагоцитов достаточно продолжительный - от 60 до 90 дней в различных органах и тканях. Этот баланс быстро меняется при попадании в организм воспалительного стимула. В таких условиях продуцируются гуморальные факторы, которые стимулируют и увеличивают образование моноцитов и их выход из костного мозга в циркуляцию с последующим накоплением в очаге воспаления. Моноциты из кровеносного русла накапливаются в месте воспаления в больших количествах, обычно соответствующих первоначальному входу ПМЯЛ. Вновь поступившие клетки подвергаются быстрой дифференциации, облегчая распознавание и удаление воспалительного стимула. Моноциты в очагах воспаления увеличиваются в размерах, усиливают секреторную деятельность и в конце концов превращаются в клетку с эпителиоидными признаками. Образование гигантских многоядерных мононуклеарных фагоцитов является общим признаком хронического воспалительного процесса; в таких местах изредка встречаются делящиеся мононуклеарные фагоциты.

Накопление мононуклеарных фагоцитов в местах воспаления

Накопление мононуклеарных фагоцитов в очагах воспаления происходит благодаря нескольким механизмам. Местные сосудистые изменения приводят к усилению кровотока и повышению проницаемости капилляров, что способствует прохождению фагоцитирующих клеток через эндотелий в окружающие воспаленные ткани. В очагах воспаления образуются хемотаксические факторы, которые служат специфическим сигналом к накоплению мононуклеарных фагоцитов. Формируется химический градиент, который воспринимается фагоцитирующими клетками с помощью специфических мембранных рецепторов. Клетки ориентируются в направлении градиента и затем мигрируют вдоль него за счет хемотаксиса. В последние годы были идентифицированы некоторые хемотаксические вещества и показано их высокоаффинное связывание со специфическими рецепторами фагоцитирующих

клеток. К этим веществам относятся продукты распада компонентов системы комплемента (особенно C5a), некоторые вещества бактериального и клеточного происхождения (лейкотриен В₄, тромбоцитарный фактор 4). В исследованиях *in vitro* показано, что связывание данных агонистов с собственными рецепторами вызывает цепь событий, приводящих к сборке сократительных белков. В результате этого происходит ориентация клеток и наблюдается их движение к источнику хемо-таксинов. Хемотаксические факторы стимулируют и другие функции фагоцитирующих клеток - образование эйкозаноидов и дегрануляцию лизосом с последующим выделением гидролитических ферментов, которые могут облегчать миграцию фагоцитов через основные мембраны кровеносных сосудов в воспаленные места.

Функции мононуклеарных фагоцитов в местах воспаления

От способности мононуклеарных фагоцитов удалять стимулы воспаления зависит исход воспалительной реакции: либо ее разрешение, либо прогрессирование с более выраженным проявлением заболевания. В области воспаления мононуклеарные фагоциты имеют три различающиеся, но взаимосвязанные функции.

Распознавание и удаление воспалительных стимулов

Мононуклеарные фагоциты обладают рядом специальных механизмов распознавания, удаления и разрушения различных стимулов, которые способны нарушать гомеостаз организма. Против инфекционных агентов фагоциты используют цитотоксические механизмы. К ним относится образование веществ, содержащих реактивный кислород (гидроксильные ионы, супероксидные радикалы и перекись водорода). Показано, что их продукция тесно связана со способностью мононуклеарных фагоцитов экспрессировать внеклеточные цитотоксические и цитоцидные свойства. Затем патогены фагоцитируются лизосомной системой клеток; комбинированное действие различных гидролизующих ферментов этой системы приводит к эффективному разрушению поглощенного материала.

Ряд специализированных рецепторных систем мононуклеарных макрофагов облегчает

распознавание и фагоцитарное удаление стимулов воспаления. В этом процессе особую роль играют продукты Т- и В-лимфоцитов (рис. 31). Антитела, синтезируемые В-лимфоцитами, связывают антигены с образованием иммунных комплексов. У мононуклеарных фагоцитов выявлено несколько (по крайней мере три) различных типов высокоаффинных рецепторов для комплекса антиген-антитело, которые обеспечивают их распознавание и удаление с помощью фагоцитоза. Поскольку они распознают Fc-фрагменты иммуноглобулинов иммунных комплексов и в некоторых случаях Fc-фрагменты свободных антител, их называют Fc-рецепторами. Другим лигандом для стимуляции фагоцитоза являются иммунные комплексы, активированные комплементом, которые связывают рецепторы для СЗЬ.

Т-лимфоциты, отвечая на иммуногены, синтезируют и выделяют ряд макромолекул, названных лимфокинами (см. главу 14), которые способствуют удалению воспалительных стимулов. Некоторые из этих молекул проявляют свою активность через мононуклеарные фагоциты. Их эффекты заключаются в подавлении движения макрофагов и расслабления клеток при стимуляции метаболиче-

ской и фагоцитарной активности, а также синтеза белка. Лимфокины усиливают способность макрофагов тормозить рост и вызывать гибель опухолевых клеток и внутриклеточных паразитов. Кроме того, лимфокины индуцируют экспрессию на макрофагах 1а антигенов, молекул, кодируемых генами главного комплекса гистосовместимости, которые необходимы для презентации иммуногенов лимфоцитам. Молекулярная структура лимфокинов установлена не полностью, но становится очевидным, что гамма-интерферон обладает некоторыми важными эффектами лимфокинов в отношении макрофагов (см. главу 29), включая экспрессию II класса антигенов главного комплекса гистосовместимости, рецепторов иммунных комплексов и комплемента, а также цитотоксичную активность и стимуляцию синтеза интерлейкина-1.

Связывание воспалительных стимулов специфическими рецепторами мононуклеарных фагоцитов инициирует процесс фагоцитоза. Фагоцитоз характеризуется инвагинацией той части плазматической мембраны, к которой присоединяется воспалительный стимул. Этот процесс опосредуется координированной деятельностью группы сократительных белков,



Рис. 31. Реакции мононуклеарных фагоцитов на продукты иммунных ответов в области воспаления.

Лимфоциты, отвечающие на иммуногенные воспалительные стимулы, продуцируют лимфокины и антитела, которые формируют иммунные комплексы. Иммунные комплексы генерируют хемотаксические стимулы, привлекающие ПМН и мононуклеарные фагоциты в область воспаления. Фагоцитирующие клетки поглощают иммунные комплексы, которые затем деградируют. Чрезмерная стимуляция фагоцитирующих клеток лимфокинами или иммунными комплексами ведет к выделению ряда медиаторов воспаления, в том числе протеиназ, вызывающих разрушение тканей. Кроме того, мононуклеарные фагоциты выделяют факторы, стимулирующие активность лимфоцитов, а также пролиферацию соединительной ткани в фиброз.

весьма напоминающих аналогичные белки гладких мышц. В фагоцитирующих клетках, особенно на периферии цитоплазмы, содержится большое количество актина и миозина. Эти белки, как и некоторые регуляторные белки, были выделены в чистом виде из альвеолярных макрофагов. Установлено, что образование псевдоподий, формирующихся вокруг воспалительных стимулов, связано с мобилизацией ионов кальция, которые стимулируют энергозависимую сборку и функционирование сократительных белков. Окруженный псевдоподиями стимулятор фагоцитоза оказывается в вакуоли, называемой фагосомой, которая направляется к лизосомам. Все эти процессы возможны лишь при наличии интактных микротрубочек. Лизосомы макрофагов содержат большое количество разнообразных протеиназ, гликозидаз и липаз с высокой специфической активностью. Эти ферменты необходимы для быстрого внутриклеточного разрушения поглощенных веществ. Кроме фагоцитоза, мононуклеарные фагоциты способны к эндоцитозу жидкости (пиноцитозу), осуществляемому специфическими и неспецифическими механизмами. Установлено, что макрофаги перитонеальной полости мышей интернализируют площадь плазматических мембран (эквивалента их общей площади) каждые 35 мин; скорость значительно возрастает при стимуляции мононуклеарных фагоцитов воспалительными стимулами.

У мононуклеарных фагоцитов определены разнообразные эндоцитарные функции, независимые от продуктов активированных лимфоцитов. В легких альвеолярные макрофаги посредством фагоцитоза удаляют ряд токсических и инертных частиц. Длительный контакт с некоторыми веществами, такими как кремний или асбест, может привести к хроническим легочным воспалительным заболеваниям, частично опосредуемым веществами, выделяемыми макрофагами. Мононуклеарные фагоциты могут также участвовать в развитии атеросклероза. Накопление измененных липопротеинов низкой плотности в мононуклеарных фагоцитах происходит с участием специфических рецепторов и приводит к образованию пенных клеток, нагруженных эфиром холестерина. Наличие таких клеток является характерным признаком атеросклеротических бляшек.

Непереваренные вещества остаются во вторичных лизосомах мононуклеарных фагоцитов в месте их первоначального взаимодействия

(татуировка - типичный пример); альтернативный этому вариант - миграция клеток из организма через дыхательную систему или пищеварительный тракт. Кроме того, некоторые популяции мононуклеарных фагоцитов обладают специализированными функциями, представляя воспалительный стимул в виде иммуногена клеткам лимфоидной системы. Лимфоциты отвечают на иммуноген образованием специфических веществ, а именно лимфокинов и антител, которые облегчают функцию мононуклеарных фагоцитов при последующих встречах с иммуногеном.

Презентация антигенов Т-лимфоцитам: запуск афферентного звена иммунной системы

В последние годы было установлено, что мононуклеарные фагоциты играют решающую роль в представлении иммуногена лимфоцитам. И хотя точные механизмы, лежащие в основе презентации, остаются неясными, известно, что в физиологических условиях иммуноген связан с мононуклеарными фагоцитами и что между клеткой, несущей иммуноген, и лимфоцитом возникает прямой физический контакт.

На рис. 32 показана последовательность представления антигена мононуклеарными фагоцитами лимфоцитам, а также последующие события в иммунной системе. Представление антигена возможно при сингенности мононуклеарных фагоцитов и лимфоцитов. Кроме того, для представления необходима прямая или непрякая связь между иммуногеном и антигенами Ia. Показано, что антитела к антигенам Ia подавляют распознавание Т-лимфоцитами иммуногена, связанного с мононуклеарными фагоцитами.

Не все мононуклеарные фагоциты имеют на своей поверхности Ia-антигены; их количество зависит не только от ткани, в которой они находятся, но и от локального микроокружения в данный момент времени. Вполне вероятно, что лимфоциты, отвечающие на представленный им антиген, могут в свою очередь увеличивать количество мононуклеарных фагоцитов, несущих Ia-антиген. Мононуклеарные фагоциты осуществляют также генетический контроль за развитием иммунного ответа. Этот контроль зависит от возможности мононуклеарных фагоцитов экспрессировать соответствующие Ia-антигены, что спо-

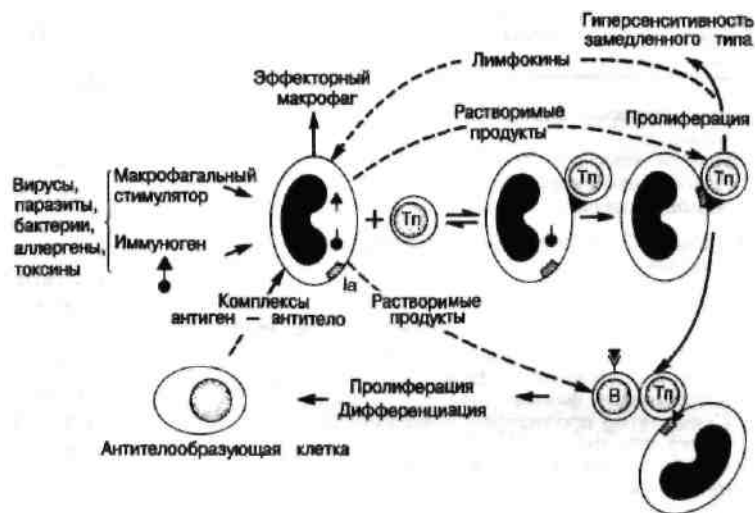


Рис. 32. Представление мононуклеарными фагоцитами иммуногенов лимфоцитам.

Иммуногены (темный кружок со стрелкой), к которым относятся вирусы, паразиты, бактерии, аллергены или токсины, захватываются и процессируются мононуклеарными фагоцитами. Процессинг включает в себя соединение специфичного домена молекулы иммуногена с Ia-детерминантами (представляют собой фенотипическую экспрессию некоторых генов главного комплекса гистосовместимости) на поверхности мононуклеарного фагоцита с последующим физическим представлением Т-лимфоцитам. Т-лимфоциты пролиферируют и образуют лимфокины, которые обладают рядом биологических эффектов, в том числе стимуляцией функции мононуклеарных фагоцитов, относящихся к удалению иммуногена и экспрессии гиперсенсибильности замедленного типа. Т-лимфоциты также рекрутируют В-лимфоциты и, обладая хелперной функцией, стимулируют их к продукции антител с последующим образованием иммунных комплексов. Эти иммунные комплексы фагоцитируются мононуклеарными фагоцитами, таким образом завершая эффекторную часть защитного процесса организма. (По Rosenthal, 1980.)

способствует клональной экспансии Т- и В-лимфоцитов для обеспечения синтеза лимфокинов и антител.

Секреторная активность мононуклеарных фагоцитов

Многогранное участие мононуклеарных фагоцитов в защите организма и в хроническом воспалении требует от них величайшей функциональной подвижности при взаимодействии с другими типами клеток, компонентами соединительной ткани и воспалительными стимулами во внеклеточной среде. В связи с этим мононуклеарные фагоциты синтезируют и секретируют большое количество биологически активных медиаторов (табл. 4). Выделение таких медиаторов происходит не одновременно: они секретируются по мере выполнения тех

функций, которые необходимы мононуклеарным фагоцитам на данной стадии воспалительного процесса. Совершенно очевидно, что продукты секреции имеют важное значение для облегчения удаления патогенных организмов и других стимулов воспаления, а также для усиления процессов репарации и устранения возникших повреждений. Возможно, что некоторые аспекты хронических воспалительных процессов должны учитываться в связи с аберрантной секрецией различных продуктов мононуклеарных фагоцитов. Некоторые продукты секретируются мононуклеарными фагоцитами постоянно, в том числе ферменты лизоцим и липопротеинлипаза, тогда как другие выделяются лишь при воздействии на мононуклеарные фагоциты воспалительными стимулами или продуктами иммунных реакций (рис. 33).

Таблица 4. Секреторные продукты мононуклеарных фагоцитов

Гидролитические ферменты Лизоцим Нейтральные протеазы Лизосомные гидролазы Липопротеиновая липаза
Ингибиторы протеолитических ферментов α ₂ -Макроглобулин α ₁ -Протеазный ингибитор
Факторы, изменяющие клеточную пролиферацию Колонистимулирующий фактор Фактор созревания тимуса Ангиогенный фактор Стимулятор пролиферации фибробластов Интерлейкин-1 Фактор-антагонист глюкокортикоидов Фибронектин Ростовый фактор, происходящий из тромбоцитов Эритропоэтин
Факторы, нарушающие жизнеспособность инфекционных агентов и эукариотических клеток Перекись водорода Гидроксильные радикалы Интерферон Листеридный фактор Белок, связывающий витамин В ₁₂ Фактор некроза опухоли
Факторы, имеющие отношение к гуморальным медиаторам воспаления Все компоненты альтернативного пути и ранние компоненты классического пути комплемента Проксагулянтный фактор Свертывающий фактор

Интерлейкин-1

Первоначально интерлейкин-1 был охарактеризован как секреторный продукт мононуклеарных фагоцитов с молекулярной массой 18 000 дальтон, который опосредует ряд важных биологических эффектов этих клеток (см. главу 15). Как показывают исследования *in vitro*, эти эффекты включают следующее: стимуляцию пролиферации тимоцитов; образование интерлейкина-2 лимфоцитами; пролиферацию фибробластов; синтез хондроцитами и синовиоцитами нейтральной протеиназы, а также простагландинов и протеиназы; синтез гепатоцитами белка острой фазы; хемотаксис лейкоцитов; резорбцию костей. *In vivo* интерлейкин-1 вызывает лихорадку, изменение уровней ионов металлов и повышение уровня белка острой фазы. Недавно были получены в чистом виде по крайней мере две формы человеческого интерлейкина-1 и идентифицированы два гена человека, которые кодируют молекулы, обладающие активностью интерлейкина-1.

Гидролитические ферменты

Гидролитические ферменты, секретлируемые мононуклеарными фагоцитами в ответ на воспалительные стимулы (иммунные комплексы, лимфокины), возможно, играют важную роль в развитии повреждений при хроническом вос-

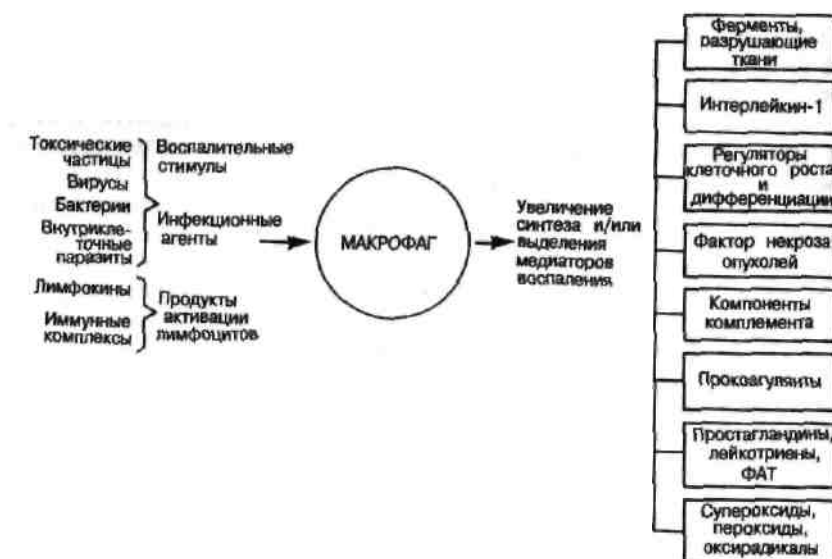


Рис. 33. Мононуклеарные фагоциты в ответ на действие инфекционных агентов, воспалительных стимулов и продуктов стимулированных лимфоцитов вырабатывают широкий спектр секреторных продуктов (детальное описание дано Davies, и соавт., 1981).

палении. Эти ферменты, включающие активатор плазминогена, эластазу и коллагеназу, вероятно, обуславливают деградацию и повреждение тканей, а также ускорение обмена соединительной ткани, что сопровождается удалением продуктов распада и заживлением зон воспаления.

Факторы клеточной пролиферации и дифференциации

Характерной чертой многих хронических воспалений является местная пролиферация тканей, связанная с очагами активированных лимфоидных клеток. Ярким примером такого процесса может служить пролиферирующий синовиальный паннус сустава при ревматоидном артрите. В подобных условиях растворимые факторы, включая интерлейкин-1 и ростовой фактор тромбоцитов, которые секретируются мононуклеарными фагоцитами, могут стимулировать пролиферацию как лимфоцитов (с последующим синтезом антител и лимфокинов), так и фибробластов, впоследствии синтезирующих коллагеназу и компоненты соединительной ткани. Этому предположению соответствует наблюдение отмены гиперсенситивности замедленного типа веществами, избирательно токсичными для мононуклеарных фагоцитов, а также нарушения заживления ран у экспериментальных животных после введения антимакрофагальной сыворотки.

Прокоагулянты

При реакциях повышенной чувствительности замедленного типа и отторжении аллогенной ткани, а также при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите и реакции Шварцмана часто наблюдается отложение фибрина. В недавних исследованиях показано, что образование фибрина в зонах поражения может инициироваться прокоагулянтной активностью, исходящей из мононуклеарных фагоцитов. Выделение такого прокоагулянтного фактора, по-видимому, зависит от сигнала Т-лимфоцитов. Мононуклеарные фагоциты могут также инициировать удаление фибрина, секретировав активатор плазминогена. Важное значение имеет тот факт, что прокоагулянтная активность является продуктом моноцитов, вновь прибывших к месту воспаления, тогда как активатор плазминогена синтезируется более дифференцированными макрофагами, которые вызревают под действием лимфокинов или других стимулов, присутствующих в очаге воспаления.

Продукты окисления арахидоновой кислоты

В фосфолипидах мононуклеарных фагоцитов содержится необычно большое количество арахидоновой кислоты, и, как выяснилось в последние годы, эти клетки обладают значительным потенциалом синтеза простагландинов и лейкотриенов. Их синтез усиливается при экспозиции макрофагов с воспалительными стимулами, включая иммунные комплексы. На основании этого открытия и уже известных эффектов экзогенных простагландинов (особенно серии E), подавляющих различные эффекторные функции лимфоцитов, было выдвинуто предположение относительно способности простагландинов мононуклеарных фагоцитов действовать в качестве ингибиторных модуляторов функции лимфоцитов *in vivo*. Это предположение подтвердили клинические исследования, где было показано повышение иммунного ответа при использовании ингибиторов синтеза простагландинов (индометацин). Предполагается, что мононуклеарные фагоциты вносят свой вклад в опосредование повышенной чувствительности немедленного типа, поскольку они синтезируют лейкотриены В₄ и С₄. Известно, что лейкотриены входят в состав медленно реагирующей субстанции анафилаксии (см. главу 10).

Метаболиты кислорода

Во время метаболического взрыва, сопровождающего взаимодействие макрофагов с фагоцитируемыми и другими стимулами, образуется ряд потенциально токсичных метаболитов кислорода. Обладая исключительно короткой жизнью, они могут опосредовать некоторые важные функции, в том числе клеточно-зависимую цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам и инфекционным агентам, инактивацию некоторых белков (ингибитор α-1-протеиназы) и образование хемотаксических стимулов при перекисном окислении ненасыщенных жирных кислот, в частности арахидоновой кислоты.

Комплемент

Белки системы комплемента содержат более 20 молекул (см. главу 12), которые активируются по принципу каскада после взаимодействия с иммунными комплексами или же непосредственно воспалительными стимулами. Продукты активации комплемента усиливают

функцию фагоцитов, стимулируя хемотаксис и фагоцитоз, а также выделение из них медиаторов. Большое функциональное значение имеет секреция многих компонентов комплекса моноцитами периферической крови человека.

Заключение

Функции мононуклеарных фагоцитов в системе защиты организма отражают широкий спектр реакций-от реакций, характеризующихся примитивными жизненными системами, до высокоспецифичных, генетически ограниченных реакций, вовлекающих клетки лимфоидной системы. Сохраняющиеся реакции, связанные с примитивными жизненными системами, включают пиноцитоз и фагоцитоз. Другие ответы связаны с участием продуктов лимфоидных клеток, в частности лимфокинов и иммунных комплексов. Наконец, высокоспецифичные, генетически рестриктированные взаимодействия с лимфоцитами в афферентном звене иммунного ответа указывают на необходимую роль мононуклеарных фагоцитов в специфическом усилении механизмов защиты организма активированными лимфоцитами. Благодаря различным механизмам мононуклеарные клетки играют важную роль в защите организма, оказывая решающее влияние на окружающие клетки и ткани как в норме, так и при патологии.

Список литературы

- Dames P., Bonney R.J., Humes J.L. & Kuehl F.A. (1981) Secretory functions of macrophages participating in inflammatory responses. In: Dingle J. T. & Gordon J. L. (eds) *Proceedings of Symposium on Cellular Interactions in Inflammation*, pp. 33-42. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Davies P., Bonney R.J., Humes J.L. & Kuehl F.A. (1985) The synthesis of arachidonic acid oxygenation products by macrophages. In: Reichard S. M. & Filkins J. P. (eds) *The Reticuloendothelial System, A Comprehensive Treatise, vol 7B*, pp. 47-66. Plenum Press, New York.
- Gallin J. I. (1980) The cell biology of leukocyte chemotaxis. In: Weissmann G. (ed.) *The Cell Biology of Inflammation, Handbook of Inflammation 2*, pp. 299-335. Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York.
- Fogelman A. M., Haberland M. E. & Edwards P. A. (1984) Low density lipoprotein receptors and scavenger receptors on monocytes and macrophages: modulation by lymphokines. *Lymphokines* 9, 363-372.
- Johnson R. B. Jr. & Kitagawa S. (1985) Molecular basis for the enhanced respiratory burst of activated macrophages. *Fedn Proc.* 44, 2927-2932.
- Metcalf D. (1985) The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Cell* 43, 5-6.
- Rosenthal A. S. (1980) Regulation of the immune response-Role of the macrophage. *New Eng. J. Med.* 303, 1153-1156.
- Unanue E. R. (1980) Cooperation between mononuclear phagocytes and lymphocytes in immunity. *New Eng. J. Med.* 303, 977-985.
- Van Furth R., Diesselhoff-Den Dulk M. C., Raeburn J. A., Van Zwet L., Crofton R. & Blusse van oud Albas (1980) Characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes. In: Van Furth R. (ed.) *Mononuclear Phagocytes Functional Aspects*, pp. 279- 298. Martinus Nijhoff, The Hague.
- Week J., Gray P. W., Rinderknecht E. & Sevastopoupos C.G. (1985) Interferon gamma: a lymphokine for all seasons. *Lymphokines* 11, 1-46.

Введение

Лимфоциты играют центральную роль в специфическом адаптивном иммунном ответе. Их мембрана (и секрет) включает в себя участки и свободные молекулы. Стволовая клетка, от которой происходят лимфоциты, находится в костном мозге и фетальной гемопоэтической ткани, например в печени плода. Лимфоциты образуют скопления, называемые лимфоидной тканью. Они мигрируют в крови, лимфе и экстрацеллюлярной жидкости. Лимфоидные ткани могут быть первичными, например тимус и сумка Фабрициуса у цыплят. Они служат местом дифференциации лимфоцитов и в норме не участвуют в пролиферации лимфоцитов при иммунном ответе. Ко вторичным лимфоидным структурам относят лимфатические узлы, селезенку и лимфоидную ткань, связанную с кишечником. В этих тканях происходит необходимая для иммунного ответа пролиферация лимфоцитов. Иммунный ответ — это экспансия специфического антигенреактивного клона лимфоцитов.

Лимфоциты участвуют в хронических воспалительных реакциях и в резистентности организма к облигатным и факультативным внутриклеточным микроорганизмам. Они также вовлекаются в резистентность к раку и в отторжение органных и тканевых трансплантатов. Эти функции выполняются главным образом лимфоцитами с антигенными рецепторами, составляющими интегральную часть клеточной мембраны. Клеточно-опосредованный иммунитет (как именуется эта функция) подавляется у крыс и мышей неонатальной тимэктомией и, следовательно, зависит от тимуса. Лимфоциты, развитие которых в поздний фетальный и ранний постнатальный периоды происходит под контролем тимуса, определяются как Т-лимфоциты (Т-клетки). Лимфоциты, участвующие в образовании антител и являющиеся предшественниками плазматических клеток, находятся под контролем сумки (бурсы) Фабрициуса (у птиц). Они соответственно определяются как В-лимфоциты (В-клет-

ки) даже у млекопитающих, несмотря на отсутствие доказательств существования у них органа, эквивалентного сумке Фабрициуса.

Кроме участия в клеточно-опосредованном иммунитете, субпопуляции Т-клеток играют важную роль в регуляции иммунного ответа, функционируя как клетки-помощники (Т_п) и клетки-супрессоры (Т_с). Данные субпопуляции распознаются по специфическим мембранным антигенам, выявляемым моноклональными антителами (у человека CD4-Т_п, CD8-Т_с). Как показано *in vitro*, лимфоциты обладают цитотоксичностью при контакте с клетками-мишенями. Вероятно, *in vivo* цитотоксическое действие бывает более сложным и осуществляется при участии ряда химических медиаторов и неспецифических эффекторных клеток, например макрофагов. Выделяют три типа цитотоксических лимфоцитов: а) цитотоксические Т-клетки; б) К-клетки, принимающие участие в антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ); в) натуральные клетки-киллеры (НК). Реакция между цитотоксическими Т-клетками и клетками-мишенями, а также АЗКЦ антигенспецифичны. НК действуют неспецифично на клетки-мишени определенных линий.

Субпопуляции лимфоцитов имеют определенные характеристики и обнаруживаются в различных областях лимфоидной ткани. Тимус состоит почти исключительно из Т-клеток. Т-лимфоциты представлены главным образом долгоживущими, высокомобильными клетками, выявляемыми в паракортикальных (тимусзависимых) областях лимфатических узлов вокруг венул с высоким эндотелием (ВВЭ), через который они мигрируют (рис. 34), а также в «тимусзависимых областях» селезенки вокруг центральных артериол. В-лимфоциты-короткоживущие, оседлые клетки, которые выявляются в терминальных центрах и их краевых зонах в лимфатических узлах, в кортикострукулярных соединениях и мозговых шнурах, а также на периферии белой пульпы и в красной пульпе селезенки. Сходные Т- и В-клеточные зоны обнаруживаются в лимфоидной ткани, связанной с кишечником. В-клетки и

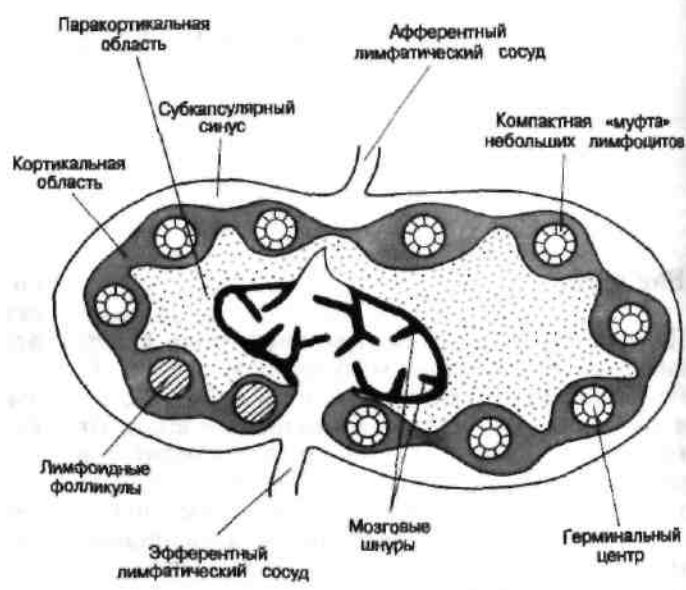


Рис. 34. Схематическое изображение иммунологически активного лимфатического узла.

T-лимфоциты расположены в параартериальной области, В-лимфоциты - в компактных «муфтах» небольших лимфоцитов, в терминальных центрах, лимфоидных фолликулах, корково-мозговых соединениях и мозговых шнурах.

T-супрессоры являются быстро обновляющимися и короткоживущими популяциями лимфоцитов.

Реакция гиперсенсибилизации замедленного типа-аллергия к иммунитету

Устойчивость организма к факультативным и облигатным внутриклеточным микроорганизмам может быть связана с реакциями повышенной чувствительности замедленного типа, которые направлены на антигены этих микроорганизмов. Гиперсенсибилизация замедленного типа (ГСЗТ) проявляется эритематозной индуративной реакцией (на коже) с максимальной выраженностью через 24-48 ч после инъекции антигена, например туберкулина. Как элиминация инфекционного агента, так и ГСЗТ являются результатом взаимодействия специфически сенсибилизированных лимфоцитов и специфического антигена. Это приводит к секреции растворимых медиаторов (известных как лимфокины), которые непосредственно активируют макрофаги с целью элиминации внутриклеточных микроорганизмов, либо для инициации выделения медиаторов воспаления, таких как простагландины.

Лимфокины принадлежат к группе медиаторов (известных как цитокины), которые образуют совокупность веществ, регулирующих

появление и активацию клеток в очагах воспаления, а также пролиферацию клеток, участвующих в иммунном ответе. Среди них T-клеточное происхождение могут иметь ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, γ -интерферон и лимфотоксин (ЛТ-ФНО α). T-клеточное происхождение установлено также для фактора некроза опухолей (ФНО α) и колониестимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов (КСФГМ). В-клетки и НК могут продуцировать ФНО α . В настоящее время большинство из этих цитокинов могут быть получены с помощью рекомбинантной ДНК и определены моноклональными антителами в ELISA. Однако первоначально их определяли биологическими методами, оценивая их влияние на клетки-мишени *in vitro*.

Описан ряд факторов, активность которых свидетельствует в пользу их участия в воспалительных процессах *in vivo*, особенно в реакциях повышенной чувствительности замедленного типа и устойчивости организма к инфекциям. Факторы, проявляющие такую активность, названы «макрофагальный хемотаксический фактор», «фактор, активирующий макрофаги», «фактор, подавляющий миграцию». Однако в настоящее время выяснилось, что большинство функций фактора, активирующего макрофаги, принадлежит γ -интерферону.

Аналогично этому, реакция ГСЗТ лежит в основе развития контактной чувствительно-

сти к простым химическим гаптенам, таким как 2,3-Динитрохлорбензол (ДНХБ), ковалентно связанным с белками кожи. Определение кожной реакции ГСЗТ к антигену инфекционного организма не означает непереносного участия ГСЗТ в механизме защиты и вовсе не обязательно свидетельствует о высокой степени резистентности организма. Устойчивость к инфекции и ГСЗТ могут быть направлены против разных антигенов, особенно у таких сложных микроорганизмов, как бактерии и паразиты. В случае менее сложных микроорганизмов (например, вирусов) резистентность и ГСЗТ могут быть вызваны одним антигеном.

Роль Т-клеток в устойчивости организма и ГСЗТ подтверждается экспериментами с использованием методов пассивного переноса. Показано, что резистентность организма к микроорганизмам (таким как туберкулезные бактерии) реакция ГСЗТ на туберкулин и контактная чувствительность к гаптенам (например, к ДНХБ) могут быть перенесены суспензией периферических Т-клеток (за исключением тимоцитов) от сенсibilизированных доноров; с помощью В-клеток или антител они не переносятся. Макрофаги сами по себе неактивны; перенос невозможен и при использовании бесклеточных экстрактов Т-клеток. Имеющиеся сообщения о пассивном переносе ГСЗТ с помощью сыворотки вызывают сомнения: действительно ли индуцировалась истинная ГСЗТ или же имела место реакция типа феномена Артюса.

Как у человека, так и у экспериментальных животных описаны два типа реакции ГСЗТ. Это «истинная туберкулиновая реакция», ко-

торая развивается в течение 96 ч или дольше и характеризуется высокой степенью индурации кожи (рис. 35). Такой тип реактивности может сохраняться многие годы после иммунизации. Второй тип ГСЗТ, известный как «сенситивность типа Джонса-Мота, характеризуется высокой степенью неустойчивости; реакция наблюдается 7-14 дней после сенсibilизации. Реакции этого типа достигают своего максимума к 24-му часу и исчезают к 48-му часу, при этом толщина кожи увеличивается незначительно или не изменяется. Реакции Джонса-Мота регулируются супрессорными клетками в большей степени, чем реакции туберкулинового типа. Подавление активности супрессорных клеток может превратить реакцию Джонса-Мота в реакцию туберкулинового типа. Реакции контактной чувствительности регулируются супрессорными клетками таким же образом, как реакции Джонса-Мота.

Гистологически реакции ГСЗТ на 24-48-й час представлены главным образом инфильтратами мононуклеарных клеток, состоящих из равного количества лимфоцитов и макрофагов. Эти клетки расположены в основном периваскулярно. При реакциях Джонса-Мота и контактной чувствительности может определяться значительное количество базофильных лейкоцитов с характерным расположением под эпидермисом, ввиду чего эти реакции получили название «кожная базофильная гиперсенситивность». Предполагается, что базофильный инфильтрат зависит от регуляции реакции на периферии супрессорными клетками.

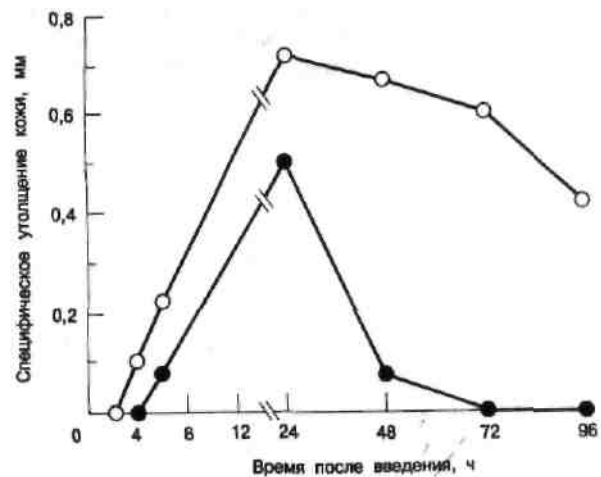


Рис. 35. Сравнительные данные о времени развития задержанных реакций гиперсенситивности туберкулинового типа (светлые кружки) и типа Джонса-Мота (темные кружки).

Рецепторы Т-клеток для антигена

Рецепторы для антигена В-клеток являются иммуноглобулиновыми молекулами, связанными с клеточной поверхностью. В течение длительного времени считали, что антигенные рецепторы Т-клеток несут идиотипические детерминанты, аналогичные наблюдаемым на антигенреактивном участке иммуноглобулиновых (Ig) молекул. В таком случае приготовленные антиидиотипические антитела к специфическому Ig могут «включать» или «выключать» Т-клетки, стимулируя Т-клеточные иммунные ответы или вызывая специфическую толерантность. Таким образом, допускается, что антигенные рецепторы на Т-клетках имеют, по существу, такие же участки распознавания, что и антитела. Однако до последнего времени структуры, подобные варибельным доменам Ig, не были обнаружены. Использование метода клонирования ДНК позволило приготовить цепи рецепторов Т-клеток и затем определить их аминокислотную последовательность. Обнаружено, что данная молекула состоит из двух доменов, соединенных двумя дисульфидными мостиками, причем размеры и общая структура доменов были такими же, как у Ig. Более того, N-концевой домен был варибельным, а C-концевой — константным, т.е. как у Ig. Структурно рецептор Т-клеток является мономером, в котором две цепи образуют одно место связывания, а каждое место независимо от других встроено в клеточную мембрану. Две примыкающие друг к другу, образуя антигенреактивный центр. Данная структура соответствует модели единичного рецептора ГКГС-рестриктированного Т-клеточного распознавания. Согласно этой модели, антиген распознается совместно с молекулами клеточной поверхности главного комплекса гистосовместимости.

Пролиферация Т-лимфоцитов *in vivo*

Главным событием иммунного ответа *in vivo* является экспансия специфического клона Т- или В-клеток после поступления антигена. По теории, основывающейся на полученных *in vitro* данных, антиген представляется рецепторам Т-клеток макрофагами или дендритными клетками, такими как клетки Лангерганса в коже. В результате этого запускается пролиферация Т-клеток, которая функционально расширяет

клон таким образом, чтобы в циркуляцию поступило достаточное количество клеток для реакции с антигеном на периферии и для запуска биологических ответов. Индуцированная антигеном пролиферация Т-клеток наиболее выражена в паракортикальных областях лимфатических узлов, дренирующих область пересадки кожного аллотрансплантата или место аппликации химического сенсибилизирующего агента. Увеличение количества больших лимфоцитов в S-фазе клеточного цикла, которые легко распознаются по их высокопиронинофильной или базофильной цитоплазме, достигает пика к 4-му дню после антигенной стимуляции (рис. 36). В любое время до 20% лимфоцитов могут быть в S-фазе; определяется также большое количество митозов. Число делящихся клеток в любой отрезок времени значительно превышает их расчетное количество при условии деления клеток одного клона. Предполагают, что большинство клеток отвечает на неспецифический стимул. Такими стимулами могут быть лимфокин интерлейкин-2 или фактор роста Т-клеток, которые секретируются другими активированными лимфоцитами. Т-лимфоциты несут рецепторы для ИЛ-2, который обладает антигенно-стью и у человека распознается моноклональным антителом (анти-Tac).

Пролиферация Т-лимфоцитов *in vitro*

Т- и В-клетки пролиферируют *in vitro* в присутствии антигена, если донор клеток сенсибилизирован. Пролиферацию клеток определяют по образованию бластных клеток или по включению ³H-тимидина. Лимфоциты также пролиферируют (неспецифически) в ответ на поликлональные лиганды или митогены. Фитогем-агглютинин и конканавалин А (Кон-А) действуют так поликлональные активаторы Т-клеток. Липополисахарид грамотрицательных бактерий и митоген чечевицы обладают некоторой специфичностью по отношению к В-клеткам. Кон-А в определенных дозах специфичен для Т-супрессорных клеток.

Хотя митогенез, вызываемый растительными лектинами, является искусственным феноменом в отношении нормальных событий, наблюдающихся в иммунной системе *in vivo*, его использование для изучения пролиферации лимфоцитов дает больше возможностей, чем исследования *in vivo*. Важно отметить, что дефект ответа лимфоцитов на митогены тесно

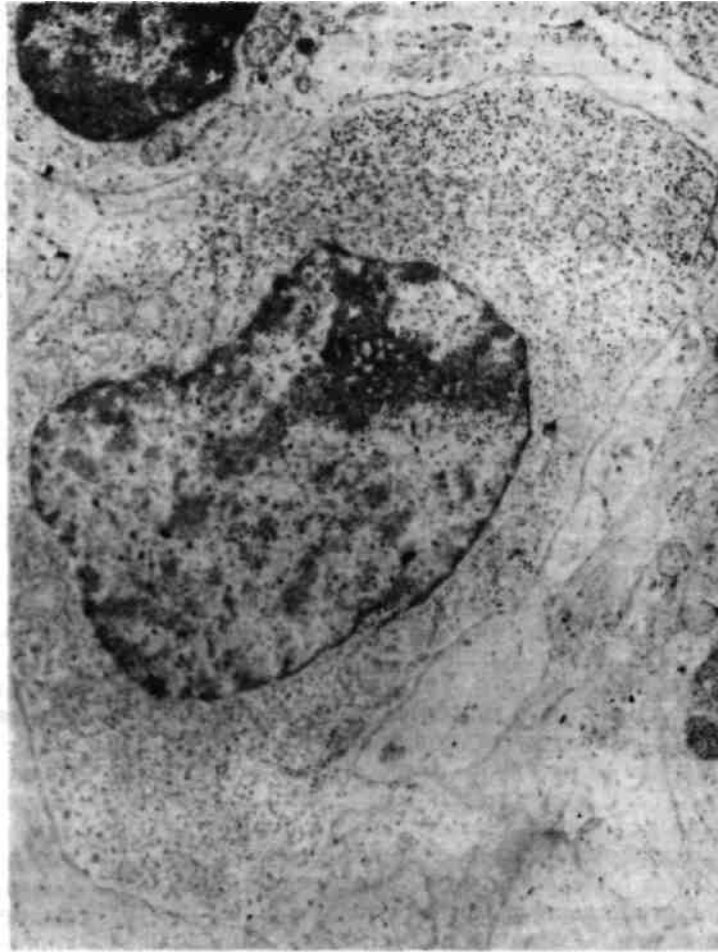


Рис. 36. Электронная микрофотография Т-лимфоцита в S-фазе клеточного цикла, пролиферирующего в лимфатическом узле после антигенной стимуляции.

связан с их неспособностью к пролиферации при ряде заболеваний, что придает этому исследованию клиническую значимость.

Трансформация и митогенез лимфоцитов могут индуцироваться и в смешанной культуре лимфоцитов, различающихся по I области главного комплекса гистосовместимости.

Макрофаги как вспомогательные клетки при индуцированной митогенами или антигенами пролиферации лимфоцитов

Удаление макрофагов из популяции лимфоидных клеток уменьшает способность Т- и В-лимфоцитов к пролиферации в ответ на ряд антигенов или митогенных стимулов. Функ-

цию «вспомогательных» клеток можно восстановить добавлением макрофагов или дендритных клеток из различных источников. Макрофаги, обработанные туберкулином, вызывают антигенспецифическую пролиферацию Т-клеток при условии исключения прямого контакта антигена с лимфоцитами. Вероятно, антиген локализуется на мембране макрофагов и в таком виде представляется лимфоцитам, причем в более доступной форме, чем свободный антиген.

Не исключено, что часть иммуностимулирующего действия макрофагов связана с представлением антигена с той части поверхности макрофагов, которая также экспрессирует Ia-антигены, кодируемые I областью генов главного комплекса гистосовместимости. Кроме того, макрофаги секретируют неспецифические

растворимые регуляторные продукты-монокины. Наиболее важный из них - интерлейкин-1 - является фактором, активирующим лимфоциты (см. главу 15). ИЛ-1 способен замещать макрофаги в реакциях тимических лимфоцитов на митогены, а также в смешанной культуре лимфоцитов. ИЛ-1 образуется макрофагами при их стимуляции ЛПС или комплексом антиген-антитело.

Вторичные передатчики при активации лимфоцитов

Митогены, вероятно, вызывают изменения внутриклеточного метаболизма, не проходя через плазматическую мембрану. Взаимодействие митогенов со своими рецепторами приводит к образованию внутриклеточных вторичных передатчиков. К наиболее изученным вторичным передатчикам относятся ионы Ca^{2+} и циклический АМФ. Показано, что скорость поступления Ca^{2+} в клетку резко возрастает при экспозиции лимфоцитов с мито-генами. Более того, трансформация лимфоцитов может быть подавлена добавлением хелаторов ионов металлов, например ЭДТА. И наконец, ионофор бивалентного катиона (A23187), переносящий Ca^{2+} через биологические мембраны, также вызывает митогенную трансформацию лимфоцитов.

Роль цАМФ как вторичного передатчика при митогенезе лимфоцитов гораздо более противоречива; имеются аналогичные данные и в отношении циклического ГМФ. В некоторых исследованиях показано увеличение циклического ГМФ в течение нескольких минут после добавления Кон-А или ФГА к лимфоцитам. Другие исследователи не смогли подтвердить эти результаты.

Участие лимфоцитов в хронических воспалительных процессах

Связь секреции лимфокинов *in vivo* с ГСЗТ

Активность лимфоцитов при хроническом воспалении *in vivo*, например при ГСЗТ, связана с местной секрецией широкого спектра лимфокинов, подробное описание которых дано в главе 14. Внутрикожное введение супернатанта культур антиген- или митогенстимулированных лимфоцитов вызывает воспалительную реакцию, весьма напоминающую ГСЗТ. Тем

не менее митогенная трансформация и секреция лимфокинов, будучи двумя независимыми событиями, могут быть разделены. Максимальные проявления воспалительной реакции, вызванной ЛК, наблюдаются через 12-24 ч после внутрикожного введения; развитие реакции сопровождается повышением проницаемости сосудов и смешанной гранулоцитарно-мононуклеарной клеточной инфильтрацией. Обуславливающая это событие фармакологическая активанта супернатанта культуры известна как «реактивный фактор кожи» (РФК); сравнительно недавно были идентифицированы его отдельные компоненты.

Помимо того, что ЛК способны вызывать воспалительные реакции, сходные с ГСЗТ, они могут образовываться при развитии ГСЗТ. При кожных реакциях могут определяться макрофагальная хемотаксическая активность и РФК. Фактор, подавляющий миграцию, и активность РФК могут быть получены из перитонеальной полости сенсibilизированных морских свинок при реакции исчезновения макрофагов. Это еще одна модель ГСЗТ *in vivo*, в которой через несколько часов после введения специфического антигена в брюшную полость макрофаги исчезают из нее, прикрепляясь к серозной поверхности. Третьим указанием на значимость продуктов активации лимфоцитов для индукции воспаления служит подавление ГСЗТ и реакции исчезновения макрофагов под действием антилимфоцитарной сыворотки. ГСЗТ не индуцируется у неона-тально тимэктомированных животных, а также после введения (животным) антилимфоцитарной сыворотки.

Образование гранулемы

Гранулема является местом хронического воспаления, которое представляет собой скопление макрофагов или других клеток серии мононуклеарных фагоцитов, обнаруживаемых вместе с клетками других типов (или без них). Хотя гранулематозные воспалительные инфильтраты могут встречаться и в отсутствие иммунологической реакции, многие формы гранулем связаны с функцией лимфоцитов. Такие гранулемы возникают при хронических инфекциях (туберкулез, туберкулезоподобная проказа и шистосомоз). Гранулемы, сопровождающие повышенную чувствительность к бериллию и цирконию, а также наблюдаемые при саркоидозе, имеют лимфоцитарное происхождение и могут быть связаны с ГСЗТ.

Узловые гранулемы развиваются в месте проведения теста кожной чувствительности при сенсибилизации к металлам или при саркоидозе в ответ на введение экстракта селезенки (тест Квайма). Такие повреждения развиваются через 1 - 3 нед после кожного теста в отличие от ГСЗТ, появляющейся через 24-48 ч.

При гистологическом исследовании гранулем, сопровождаемых повышенной активностью лимфоцитов, клетки системы мононуклеарных фагоцитов имеют признаки эпителиоидных клеток. Эпителиоидные клетки отличаются от фагоцитирующих макрофагов тем, что они не фагоцитируют и нередко обнаруживают наличие шероховатого эндоплазматического ретикулума, что свидетельствует об определенной секреторной функции. Эти клетки несут специфический макрофагальный антиген активации точно так же, как активированные фагоцитирующие макрофаги. Эпителиоидноклеточные гранулемы обычно сопровождаются значительной активацией фибробластов и увеличением синтеза коллагена, что в некоторых случаях может привести к быстрому разрешению повреждений.

Роль лимфоцитов, особенно Т-клеток, изучалась в экспериментальных моделях образования гранулем в легких после внутривенного введения мышам яиц шистосом. У животных, предварительно сенсибилизированных антигенами шистосом, определяется увеличение количества гранулем. Гранулемы не развиваются у тимэктомированных животных или после введения (мышам) антилимфоцитарной сыворотки.

Экспериментальный аллергический энцефаломиелит как аутоиммунное состояние

Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) вызывается сенсибилизацией экспериментальных животных тканью гомологичного или гетерологичного головного или спинного мозга в полном адьюванте Фрейнда (см. главу 28). Болезнь проявляется параличом одной из задних конечностей и сопровождается смешанной периваскулярной инфильтрацией лимфоцитов и макрофагов в головном и спинном мозге. ЭАЭ переносится лимфоцитами у инбредных морских свинок и не развивается у неонатально тимэктомированных крыс. Хроническая, затихающая и вновь обостряющаяся форма заболевания может быть вызвана у морских свинок (инбредная линия ХШ), иммунизированных вскоре после рождения. Де-

миелинизация и другие признаки делают эту экспериментальную модель близкой к рассеянному склерозу у человека. Поражения головного и спинного мозга по некоторым признакам напоминают ГСЗТ в коже, что говорит о сходстве с взаимодействием лимфоцитов и макрофагов при участии лимфокинов *in vivo*.

Состояния, связанные с дефицитом лимфоцитов

Значимость лимфоцитов, в частности Т-клеток, для ряда биологических состояний подтверждается неспособностью неонатально тимэктомированных мышей, крыс и цыплят воспроизводить подобные состояния. Многие из таких реакций могут отменяться и антилимфоцитарной сывороткой, в том числе ГСЗТ, контактная чувствительность, отторжение аллотрансплантата, трансформация лимфоцитов *in vitro* митогенами и антигенами, устойчивость организма к целому ряду облигатных и факультативных внутриклеточных организмов, грибов и простейших. У людей нарушение развития третьей и четвертой жаберных дуг может обусловить врожденную недостаточность вилочковой железы. Дефицит лимфоцитарных стволовых клеток может привести к нарушению развития Т- и В-клеток. Иммунные дефекты могут быть частичными или полными, необратимыми или восстановимыми со временем.

Ретровирусная инфекция, особенно вирус иммунодефицита человека, который обладает аффинитетом к антигену CD4, может привести к развитию синдрома приобретенного иммунного дефицита. При этом отмечается уменьшение нормального отношения Т_п:Т_с-CD4:CD8, что связано с сокращением числа Т-клеток-помощников. В результате нарушаются все указанные выше функции Т-клеток, включая снижение устойчивости к оппортунистическим инфекциям. Аномальные грибковые инфекции и кандиды постоянно обнаруживаются при тяжелых, быстро прогрессирующих заболеваниях, вызванных *Micobacteria* и *Pneumocystis carinii*. У больных развиваются редкие злокачественные новообразования, особенно саркома Капоши. У больных, получающих антилимфоцитарный глобулин или азатиоприн, а также при некоторых врожденных иммунодефицитных состояниях отмечается тенденция к развитию ретикулоклеточных сарком или лимфосарком.

Цитокины как регуляторы функции лимфоцитов

Интерлейкины

Интерлейкины являются наиболее важными регуляторными молекулами, образуемыми лимфоцитами и моноцитами. Роль этих молекул была установлена главным образом в экспериментах *in vitro* с использованием пролиферации лимфоцитов. Интерлейкин-1 первоначально был описан как фактор, активирующий лимфоциты и присутствующий в культуре макрофагов. ИЛ-1 способен замещать макрофаги в пролиферативной реакции лимфоцитов на аллоантиген (см. главу 15). Такой вывод был сделан при проведении экспериментов, в которых культуральная среда человеческих и мышинных макрофагов, стимулированных липополисахаридом, усиливала ответ мышинных тимусных клеток и периферических Т-клеток на митоген (липополисахарид). Сейчас известно, что ИЛ-1 представляет собой пептидную молекулу с массой 17 500. Данная молекула обладает различными формами активности, из которых наиболее интересна активность уже известного эндогенного пирогена. Кроме того, ИЛ-1 обладает следующими способностями:

а) вызывает выделение ИЛ-2 Т-клетками; б) усиливает ответы антител *in vitro*, действуя на Т- и В-клетки; в) усиливает цитотоксичность лимфоцитов; г) индуцирует маркеры Lyt (субпопуляция лимфоцитов); д) увеличивает образование стабильных Е-розеток; е) индуцирует синтез колагеназы и простагландинов в синовиальных клетках; ж) вызывает пролиферацию фибробластов; з) индуцирует образование амилоида сыворотки. ИЛ-1 может также участвовать в Т-клеточной супрессии.

Открытие ИЛ-2 (Т-клеточный ростовой фактор) явилось результатом следующего наблюдения: супернатант стимулированных митогеном (Кон-А) лейкоцитов периферической крови человека содержит фактор, вызывающий пролиферацию клеток *in vitro*. Получение ИЛ-2 стало возможным при использовании долгоживущих культур клонированных Т-клеточных популяций. Показано, что очищенный ИЛ-2 способен осуществлять следующие функции:

а) он запускает пролиферативную экспансию активированных клонов Т-клеток; б) усиливает митогенез тимоцитов; в) усиливает формирование бляшкообраз-

зующих клеток к эритроцитам барана у мышей-nude с дефицитом Т-клеток;

г) индуцирует аллоантигенспецифичные тимоциты и цитолитическую активность Т-клеток мышей-nude (см. главу 30). ИЛ-2 является гликопротеином, который элюирует с гель-фильтрационных колонок с молекулами, имеющими массу от 25000 до 40000 дальтон. В других исследованиях указывается молекулярная масса около 20000. Предполагается, что образование ИЛ-2 стимулируется и регулируется ИЛ-1. Однако некоторые исследователи полагают, что ИЛ-1 не является необходимым для образования ИЛ-2, а нужен только для регуляции его продукции. Эти авторы рассматривают ИЛ-2 как необходимый внеклеточный митогенный сигнал для Т-клеток, стимулированных поликлональными активаторами и антигенами. Митогенная активность ИЛ-2 приводит к клональной экспансии незрелых тимоцитов и лимфоцитов, которые затем дифференцируются в зрелые цитотоксические, супрессорные или хелперные клетки.

Мощным влиянием на регуляцию иммунного ответа обладают, помимо интерлейкинов, лимфокины, активирующие макрофаги. Лимфокины первоначально были описаны как растворимые факторы активированных *in vitro* лимфоцитов, которые подавляют миграцию макрофагов из капиллярных трубочек. Сейчас известно, что они вызывают глубокие изменения метаболизма макрофагов. Метаболические эффекты включают повышение уровней глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, окислительной активности НАДФН, активности сукцинатдегидрогеназы и р-глюкуронидазы. В других исследованиях отмечается повышение уровня внутриклеточного цГМФ и не обнаруживается увеличения цАМФ.

Интерлейкин-3 - гемопоэтический ростовой фактор, который поддерживает рост полипотентной стволовой клетки, частично приводя к дифференциации в сторону миелоидного ряда. ИЛ-3 также индуцирует экспрессию Thy-1 антигена Т-лимфоцитов. Он присутствует в супернатантах культур Т-клеток-помощников. ИЛ-4 вызывает активацию, пролиферацию и дифференциацию В-клеток, является фактором роста Т-клеток и ряда других клеток. ИЛ-5 является активирующим, ростовым и дифференцирующим фактором В-клеток; он также вызывает дифференциацию эозинофилов. ИЛ-6 продуцируется активированными Т-клетками или Т-клеточными линиями и способен стимулировать В-клетки человека.

Интерферон и лимфотоксин

Интерферон является еще одной макромолекулой, которая может играть важную роль в регуляции иммунного ответа (см. главу 29). ИФН может иметь лимфоцитарное происхождение. Показано, что ИФН обладает рядом иммуномодулирующих эффектов. К ним относятся подавление и стимуляция ответа антител, подавление гиперсенситивности замедленного типа и отторжения трансплантата, супрессия митогенеза лимфоцитов, активация макрофагов, увеличение экспрессии поверхностных антигенов лимфоцитов и выделение гистамина базофилами. Кроме того, интерферон повышает цитотоксичность Т-клеток, антитело-зависимую клеточную цитотоксичность, активность естественных киллеров. Указанные формы активности присущи прежде всего ИФН- α , который образуется Т- и В-клетками, а также макрофагами. Многими из перечисленных форм активности обладает и ИФН- γ , образуемый активированными Т-лимфоцитами.

Лимфотоксин - это вещество, относящееся к фактору некроза опухолей (ФНО α ; иногда его называют ФНО γ , так как оба вещества обладают сходными биологическими и структурными свойствами). ФНО α образуется макрофагами, а ФНО γ -активированными Т-клетками. Лимфотоксин цитотоксичен для определенных опухолевых клеточных линий и вызывает геморрагические некрозы некоторых опухолей. Предполагается, что ФНО α и ФНО γ ответственны за ряд воспалительных эффектов, наблюдаемых при реакциях гиперсенситивности замедленного типа и ранее относимых к кожным реактивным факторам.

Простагландины

Простагландины - это широко распространенное семейство соединений, производных полиненасыщенной жирной кислоты (арахидоновой), которые образуются при участии циклооксигеназной активности. Показано, что ПГЕ $_2$, pgF_2 , pgF_{2a} (простациклин) и TA_2 (тромбоксан) синтезируются макрофагами некоторых видов. Макрофаги обладают активной циклооксигеназной системой. Лимфоциты не обнаруживают способности к синтезу ПГ, поэтому вполне логичным представляется проведение исследования влияния ПГ на Т-клетки, pgEj и ПГЕ $_2$ в отличие от pgF_{1a} или ПГЕ $_{2(1)}$ могут вызвать быстрое 2-4-кратное увеличение цАМФ в тимоцитах, что через 2-4 ч приводит

к их пролиферации. ПГЕ $_1$ также вызывает быструю экспрессию Thy-1 антигена в культуре эмбриональных мышечных тимусов. Большинство исследований иммунорегуляторных эффектов ПГ в отношении функции Т-клеток проведено на моделях митогенного или антигенного бластогенеза. Во многих публикациях сообщается о подавлении митогениндуцированного бластогенеза pgEj и ПГЕ $_2$, а также об отмене супрессии индометацином. ПГЕ значительно подавляет продукцию Т-клетками лимфокина-фактора, угнетающего миграцию. ПГ могут также угнетать способность сенсибилизированных Т-клеток к специфическому лизису опухолевых клеток-мишеней. Однако для этого требуются высокие концентрации ПГ.

Предположительно ПГ оказывают подавляющее влияние на пролиферацию лимфоцитов через активацию аденилатциклазы и повышение уровня цАМФ. ПГ, повышая внутриклеточный уровень цАМФ, усиливают бластогенез тимоцитов, но подавляют бластогенез циркулирующих Т-клеток, не разделенных на субпопуляции. Из этого наблюдения был сделан вывод об основном действии, связанном с супрессорными клетками периферической крови. Ингибиторы синтеза простагландинов, такие как индометацин, подавляют функции Т-клеток-супрессоров в культуре лимфоцитов, стимулированных Кон-А. На функции В-клеток ПГ оказывают модулирующее действие. Индометацин усиливает формирование антителопродуцирующих клеток на эритроциты барана. Вероятно, что на Т-клетки-помощники ПГ влияют так же, как на В-клетки.

Гормоны вилочковой железы

С тех пор как была открыта роль вилочковой железы в регуляции иммунного ответа, был разработан целый ряд препаратов тимусного происхождения. Многие из них химически охарактеризованы. К главным препаратам относят следующие: тимозин, тимопэтин, тимический гуморальный фактор и сывороточный фактор вилочковой железы.

Тимозин

Этот препарат является неочищенным экстрактом сыворотки телят, а изученный активный препарат обычно называют 5-й фракцией тимозина. Эта фракция состоит из ряда пепти-

дов; некоторые из них происходят от тимического эпителия, а остальные - от тимоцитов. Определена аминокислотная последовательность пептидов, обладающих биологической активностью; так, тимозин-сц состоит из 28 аминокислотных остатков. Пятая фракция тимозина и некоторые ее биологически активные пептиды используются в экспериментальных моделях, а также при иммунодепрессии у больных раком и при тяжелых вирусных инфекциях. Показано, что большинство функций Т-клеток индуцируется или усиливается этими препаратами. Важно отметить, что помимо усиления эффекторных функций Т-клеток 5-я фракция тимозина и особенно тимозин 7 индуцируют образование супрессорных клеток у мышей. Аналогичный эффект наблюдается у людей. Учитывая данное наблюдение, необходимо рационально использовать препараты этого типа, пока не будет произведена очистка отдельных пептидов, а также точное определение их клеток-мишеней.

Тимопоэтин

Тимопоэтин был первоначально получен в ходе исследований на экспериментальной модели миастении гравис и охарактеризован в соответствии с его влиянием на нейромышечную передачу. Было показано также влияние тимопоэтина на раннюю дифференциацию Т-клеток. Тимопоэтин химически охарактеризован, он представляет собой полипептидную цепь, содержащую 49 аминокислот. В последующем Гольдштейн и его коллеги выделили пентапептид с аналогичной биологической активностью, который был назван ТП5. ТП5 исследован в ряде экспериментальных мышинных моделей. В частности, пентапептид эффективен при экспериментальном аутоиммунном заболевании животных.

Гуморальный фактор вилочковой железы

Данный фактор представляет собой пептид (молекулярная масса 3000), выделяемый из диализата неочищенного экстракта вилочковой железы. На модели «трансплантат против хозяина» *in vitro* гуморальный фактор вилочковой железы и подобные ему препараты способны восстанавливать иммунную активность

лимфоцитов неонатально тимэктомированных мышей.

Гуморальный фактор вилочковой железы 1 используется при лечении иммунодепрессивных состояний у людей.

Сывороточный химический фактор

Сывороточный тимический фактор (СТФ) является единственным гормоном вилочковой железы, который приготавливается не из экстракта железы теленка. Он представляет собой нонапептид (молекулярная масса 900), выделенный из сыворотки, но еще не синтезированный. STF способен индуцировать маркеры Т-клеток (Thy-1 мембранный антиген) у предшественников Т-клеток и отсутствует в сыворотке тимэктомированных животных. В ряде тестовых систем действие STF аналогично (но не идентично) действию тимопоэтина.

Одно из направлений в изучении тимических факторов - исследование их влияния на процессы старения. Уровни тимопоэтина и STF в сыворотке с возрастом снижаются. Иммунитет старых мышей восстанавливается после введения ТП5. Как и тимозин, STF в высоких концентрациях обладает стимулирующим действием на Т-супрессорные клетки, поэтому он может подавлять сенсibilизацию к динитрофторбензолу и отторжение кожного трансплантата. У человека STF в определенных условиях угнетает образование Т-клеток-супрессоров *in vitro*.

Список литературы

- Hamblin A.S. (1988) *Lymphokines*. IRL Press, Oxford. Howard J. (1984) The T-cell antigen receptor-paradigm regained. *Immunol. Today* 5, 188-189.
- Hume D.A. & Weidemann M.J. (1980) *Mitogenic Lymphocyte Transformation*. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- Moiler G. (ed.) (1984) T-cell receptors and genes. *Immunological Reviews* vol. 81, Munksgaard, Copenhagen.
- Pernis B. & Vogel H.J. (eds) (1980) *Regulatory T-lymphocytes*. Academic Press, New York.
- Simonsen M. (1984) May T3 protect us. *Immunol. Today* 5, 314-315.
- Turk J. L. (1980) *Delayed Hypersensitivity*, 3rd ed., Elsevier/ North Holland, Amsterdam.
- Yoshida T. (1983) Lymphokines mediate and regulate *in vivo* delayed hypersensitivity reactions. In: Hadden J. W., Che-did L., Dukor P., Spreafico F. & Willoughby D. (eds) *Advances in Immunopharmacology* 2. pp. 609-614. Pergamon Press, Oxford.

М.М. Дейл, Т-П.Д. Фан (M.M. Dale, T-P.D. Fan)

Сосудистый эндотелий представляет собой непрерывный монослой клеток, выстилающих люминальную поверхность кровеносных сосудов всего организма и отделяющих кровь от субэндотелиальных тканей. Этот монослой не является пассивным барьером между кровью и тканями. Это метаболически активная ткань, обладающая многочисленными функциями. Подробные сведения об этих функциях были получены лишь в последнее десятилетие благодаря развитию эффективных методов культивирования эндотелиальных клеток *in vitro*.

Эндотелиальные клетки различных органов и тканей не идентичны и различаются по своей структуре или функции. Например, некоторые эндотелиальные слои обладают преимущественно плотными соединениями между клетками, что характерно для гематоэнцефалического барьера; в костном мозге подобные соединения отсутствуют. В легких клетки эндотелия в отличие от других сосудистых областей способны метаболизировать циркулирующие пептиды. Эндотелиальные клетки посткапиллярных венул активно отвечают на циркулирующие в крови вещества повышением проницаемости сосудов. Подобной способностью не обладают клетки эндотелия капилляров и артериол.

В функциональном плане эндотелий наделен широким спектром форм активности, но в этой главе основное внимание будет уделено тем функциям, которые имеют отношение к воспалительным и гиперсенситивным реакциям. Приведенные здесь данные были получены частично в исследованиях *in vivo*, частично-*in vitro* на культурах клеток. Следует подчеркнуть, что в большинстве исследований *in vitro* использовались эндотелиальные клетки достаточно крупных кровеносных сосудов, поскольку разработка методов длительного культивирования больших количеств эндотелиальных клеток микрососудов находится лишь на своем начальном этапе. Следует также отметить, что эндотелиальные клетки *in vivo* являются по существу покоящимися и в нормальных условиях уровень обмена в них достаточно низок.

Эндотелиальные клетки *in vitro* имеют повышенную скорость обмена и часто весьма напоминают «травмированные» клетки *in vivo*. Более того, эндотелиальные клетки в отличие от фибробластов и гладкомышечных клеток облигатно растут монослоем как *in vivo*, так и *in vitro*, проявляя характерное контактное торможение и осуществляя межклеточные контакты. Не следует также забывать о разносторонности эндотелиальных клеток в отношении некоторых функций *in situ*. Так, люминальная поверхность клетки обладает механизмами предупреждения адгезии тромбоцитов (см. ниже), тогда как ее противоположная поверхность способствует тромбогенезу. Ангиотензинконвертирующий фермент локализуется на люминальной поверхности, а коллагеназа-на противоположной. Такая «ориентация по сторонам» у клеток в культуре не очевидна.

Подавляющее большинство сосудистых эндотелиальных клеток организма находится в микрососудах, главным образом в капиллярах (рис. 37). Стенки сосудов микроциркуляторно-го русла состоят из концентрических, послойно расположенных тканей, причем слои варьируют в зависимости от типа сосудов (рис. 38). Эндотелий примыкает к базальной мембране поверхностью, противоположной люминальной. Стенка капилляров и посткапиллярных венул состоит в основном из этих двух элементов. В этой части сосудистого русла с эндотелиальными клетками связаны перициты - длинные, узкие клетки (длина 150-200 мкм, ширина 10-25 мкм) (см. рис. 38). Они располагаются на базальной мембране, образуя прерывистый слой, распространяющийся от артериол до мышечных венул. На этом отрезке имеются и переходные формы между перицитами и гладкомышечными клетками. Перициты *выполняют* сократительную *функцию* и обеспечивают механическую поддержку эндотелиальных клеток. Имеются свидетельства в пользу фагоцитарной активности перицитов. Кроме того, перициты могут служить источником недифференцированных мезенхималь-

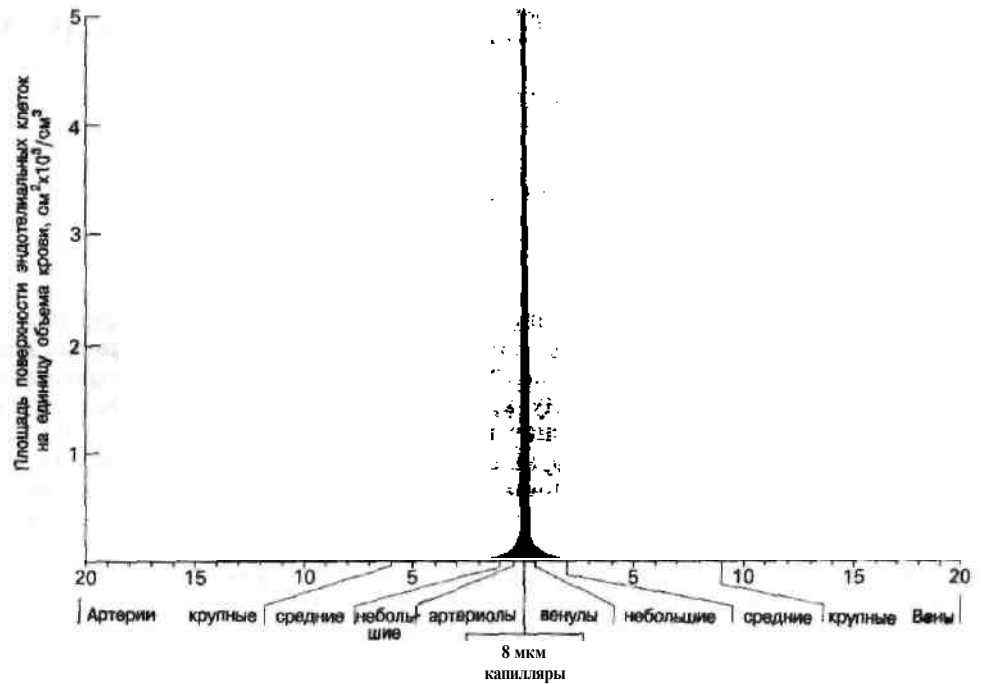


Рис. 37. Площадь поверхности эндотелия, приходящегося на единицу объема крови, выражена как функция диаметра сосудов на различных участках циркуляции.

Для вычисления использовалось отношение площади цилиндрической поверхности сосудов диаметром от 8 мкм (капилляры) до 20 мм (крупные артерии и вены) к 1 см³ объема [Busch и соавт.-Lab. Invest., 1982, 47, 498].

ных клеток при воспалительных и препаративных процессах.

Эндотелий небольших артериол и посткапиллярных венул имеет непосредственное отношение к воспалительной реакции. Артериолы контролируют переход клеток и плазмы из крови в область воспаления. Венулы принимают участие в контроле направленного из сосудов потока жидкости и медиаторов, комплемента, антител, а также в контроле прохождения клеток непосредственно в зону внедрения патогена или другого вредоносного агента (см. главу 18). Эндотелиальные клетки данной части микроциркуляции сравнивают со стражниками, которые отвечают на различные химические сигналы инициацией соответствующих реакций, регулирующих доставку ме-

диаторов и клеток, участвующих в воспалении, в зону поражения. Однако исследования в культуре клеток пока не выявили различий между эндотелиальными клетками из различных областей микроциркуляции.

Морфология эндотелия

Сосудистые эндотелиальные клетки представляют собой уплощенные полигональные клетки длиной 25-50 мкм и шириной 10-15 мкм, которые образуют одноклеточный слой на внутренней стороне кровеносных сосудов, причем длинная ось клеток ориентирована в направлении кровотока. Толщина концов клеток очень невелика (1 мкм в артериях и менее 0,1 мкм

Рис. 38. Основные структуры микроциркуляции и их взаимосвязь с остальными частями сосудистого ложа." Детальное строение стенки посткапиллярной венулы представлено в нижней части рисунка [Rodin J. A. G.- In: Handbook of Physiology: The Cardiovascular System II, Chap. I/Eds. D. F. Bohr, Somlyo, Spaks].

Гистамин - медиатор аллергических и воспалительных реакций

М.М. Дейл, Дж. К. Формен (M. M. Dale, J. C. Foreman)

Эта часть книги, куда входит данная глава, называется «Медиаторы», поскольку она посвящена химическому взаимодействию клеток, которые первично активируются при воспалительных или аллергических реакциях, со всеми другими клетками, участвующими в этих реакциях. Мы хотели провести аналогию между нейротрансмиттерами и медиаторами иммунитета и воспаления и показать их общие свойства, отметив, в частности, то, что они являются химическими веществами, переносящими информацию. На роль нейротрансмиттеров и медиаторов воспалительных или иммунных реакций было предложено множество веществ. Принадлежность того или иного вещества к нейротрансмиттерам определяется тем, насколько оно соответствует четким критериям, первоначально предложенным Dale в 1933 г. Лишь в очень немногих работах аналогичные критерии адекватно используются для оценки медиаторов иммунных и воспалительных реакций, что весьма затрудняет наше понимание этих реакций. Обсуждение различных предполагаемых медиаторов осложняется подобной «вариабельностью» критериев, поскольку экспериментальная работа просто отсутствует. Тем не менее мы полагаем, что разъяснение таких критериев может быть полезным подходом к разрешению некоторых вопросов, касающихся медиаторов в рассматриваемых реакциях. Мы попытаемся проиллюстрировать этот подход на примере гистамина, который является классическим медиатором повышенной чувствительности немедленного типа и острого воспаления и о котором существует больше информации, чем о других предполагаемых медиаторах.

В ранних исследованиях проводилось определение химических передатчиков нервной системы, которые обладают позитивным (возбуждающим) постсинаптическим эффектом. Однако наряду с постсинаптической активацией должны существовать нейротрансмиттеры, обладающие тормозящим действием. В настоящее время установлено, что в дополнение к этим эффектам передатчики могут

оказывать пресинаптическое действие, регулируя собственный выброс.

Аналогичные условия существуют и для медиаторов воспалительных и иммунных реакций. Эти вещества ответственны не только за позитивную передачу информации, но вместе с другими веществами могут также препятствовать ее распространению. Для определенных возбуждающих медиаторов конкретного эффекта, таких как гистамин, имеются соответствующие тормозящие медиаторы - некоторые простагландины, например. Более того, гистамин может облегчать или подавлять действие других медиаторов и даже угнетать собственное выделение.

Основные характеристики воспалительных и аллергических реакций

Прежде чем начать рассмотрение самих медиаторов и тех критериев, которым они должны удовлетворять, чтобы соответствовать своему наименованию, неплохо было бы ответить на вопрос: медиаторами чего они являются? Хотя в главе 1 дано краткое описание природы воспалительных и иммунных реакций на внедрение в организм чужеродного материала в виде микроорганизма или химического вещества, не лишним будет вспомнить основные признаки воспалительных реакций, о которых Цельс сказал так: воспалительная реакция проявляется «краснотой, опухолью, жаром и болью».

Краснота (или покраснение) обусловлена расширением сосудов и увеличением кровотока в очаге воспалительной реакции.

Опухоль (или отек) вызвана как повышенной проницаемостью сосудов с перемещением жидкости во внесосудистые тканевые пространства, так и инфильтрацией различными клетками. При хронических состояниях является преобладание клеточной инфильтрации, что сопровождается организацией фибрина, коллагена и других матриц.

Жар (или повышение температуры) обусловлен увеличением кровотока в результате расширения сосудов.

Боль вызывается стимуляцией афферентных нервов повышенным давлением, возникшим в результате отека, а также химическими медиаторами, выделяемыми в очаге воспаления.

Пятая характеристика воспаления, которая не упомянута Цельсом, заключается в изменении функции ткани. Примером может служить спазм гладких мышц бронхиол при астме или ограничение подвижности воспаленного сустава.

Как уже отмечалось во введении и в первой части книги, в результате действия медиаторов клетки, накапливающиеся в области поражения, проявляют (часто одновременно) самую разнообразную активность и функции, поэтому события, которые опосредуются медиаторами при аллергии и воспалении, гораздо сложнее, чем при передаче нервных импульсов.

Критерии оценки медиаторов

По Dale (1933), для отнесения того или иного вещества к группе медиаторов оно должно удовлетворять определенным критериям, приведенным ниже в некоторой модификации.

1. Нанесение агента должно вызывать эффект, наблюдаемый при острой воспалительной или аллергической реакции не только *in vitro*, но и *in vivo*. В ситуации, когда множество медиаторов участвуют в сложном эффекте, выявление соответствия этому критерию, особенно *in vivo*, может быть сложной экспериментальной задачей.

2. При воспалительной или аллергической реакции в тканях *in vivo* и *in vitro* должно выделяться или образовываться достаточное количество предполагаемого медиатора.

3. Ферменты, необходимые для образования предполагаемого медиатора, должны обнаруживаться в местах его продукции, а их активность должна возрастать под действием воспалительного стимула, вызывающего ускорение обмена медиатора.

4. Должен существовать механизм остановки действия медиатора, чтобы его эффект не продолжался неопределенно долго. Прекращение действия медиатора в норме требует наличия или катаболического фермента в месте воспалительной реакции, или процесса захвата в некоторых клетках, которые могут удалять

медиатор. Десенсибилизация органа-мишени к медиатору также может прекращать его действие. Такая десенсибилизация осуществляется другим, вторичным, медиатором, действующим либо как модулятор, либо по принципу down-регуляции соответствующих рецепторов.

5. Фармакологическое вмешательство в синтез, хранение, выделение, метаболизм или в действие агента должно вызывать предсказуемые изменения воспалительной реакции как *in vitro*, так и *in vivo*.

6. Экспериментальные или клинические состояния, связанные с дефицитом медиатора или метаболизирующих его ферментов, должны сопровождаться соответствующим уменьшением или увеличением аллергических или воспалительных явлений.

7. Рецепторы или другие механизмы активации медиатора должны обнаруживаться на соответствующих клетках фармакологическими методами и(или) методом связывания.

Гистамин как медиатор

Гистамин, или В-имидазолэтиламин, был независимо, но почти одновременно выделен из биологического источника и синтезирован химическими методами. Kitcher идентифицировал его в качестве активного начала спорыньи, а Windaus и Vogt получили его путем синтеза. Dole и его коллеги начали и продолжили интенсивное исследование биологического действия гистамина.

Dale и Schultz независимо друг от друга показали, что реакция гиперсенситивности немедленного типа (анафилактическая реакция) является прямым следствием взаимодействия антигена и ткани, сенсibilизированной антителами. Dale показал, что нанесение гистамина на гладкую мышцу *in vitro* или (в определенной мере) внутривенная инъекция гистамина животным воссоздает многие признаки анафилактической реакции. В то же время Abel и его сотрудникам удалось экстрагировать гистамин из тканей; впоследствии он был обнаружен практически во всех тканях млекопитающих. Особенно много гистамина в коже, легких, кишечнике, но больше всего в слизистой оболочке желудка.

Таким образом, уже в самых ранних исследованиях было установлено присутствие гистамина в тех тканях, где наблюдаются анафилактические и аллергические реакции. Кроме того, нанесение экзогенного гистамина на изолированные ткани и введение его живот-

ным воспроизводит ряд признаков таких реакций.

Некоторое время спустя Bartosch, Feldberg и Nagel подтвердили еще один критерий. Они показали, что антигенная стимуляция sensibilizированной ткани легких (модель гиперсенситивности немедленного типа) вызывает выделение гистамина из тканей. Последующие исследования показали выделение гистамина кожей при воспалении, обусловленном высокой температурой.

После работы Dale, где было продемонстрировано сокращение мышц в ответ на гистамин, и более позднего исследования, показавшего (более специфически) сокращение гладких мышц бронхоид, Lewis показал, что внутрикожная инъекция гистамина почти всегда воспроизводит утроенный ответ кожи на повреждение. Утроенная кожная реакция на повреждение заключается в локальном покраснении непосредственно в точке повреждения, которое быстро распространяется (по окружности) на несколько сантиметров. По мере уменьшения красноты начинает развиваться локальный отек (вокруг места травмы). Все эти признаки возникают после введения гистамина, но отсутствуют при введении изотонического раствора хлорида натрия. Покраснение при утроенном ответе кожи является результатом расширения артериол гистамином, тогда как отек (или волдырь) обусловлен протеканием жидкости из посткапиллярных венул, проницаемость которых увеличивается под действием гистамина. Эти прямые наблюдения действия гистамина на сосуды кожи соответствуют таковым Dale, отметившего сосудорасширяющие эффекты гистамина *in vivo*. Гистаминовый шок, развивающийся после внутривенного введения гистамина животным, характеризуется выраженной гипотонией и спазмом бронхов и весьма напоминает анафилактический шок.

Таким образом, гистамин соответствует критериям, согласно которым медиатор должен вызывать определенные эффекты после его введения как *in vitro*, так и *in vivo*. Гистамин вызывает расширение сосудов, повышение их проницаемости и сокращение гладких мышц, а также зуд и боль в месте инъекции (в некоторых областях). Гистамин не дает лишь одного признака острого воспаления-накопления клеток в месте воспаления.

Знания о существовании гистамина в тканях и его выделении под действием воспалительных и иммунных стимулов значительно

расширились благодаря классическим исследованиям Riley и West, идентифицировавших тучные тучные клетки как главный источник гистамина. Гистамин присутствует также в базофильных лейкоцитах крови и (у некоторых видов) в тромбоцитах. Кроме того, гистамин содержится в нейронах головного мозга и в слизистой оболочке желудка, однако эти его источники, по-видимому, не играют роли в воспалении.

Идентификация тучных клеток как тканевых депо гистамина побудила к проведению исследований, показавших, что иммунный стимул способен инициировать выделение гистамина (см. главу 2).

Кроме того, многие воспалительные стимулы, такие как С3а, С5а, физическая травма и разнообразные химические вещества, вызывают выделение гистамина из тучных клеток.

Тучные клетки и базофильные лейкоциты, помимо выделения гистамина, способны синтезировать его с помощью фермента гистидиндекарбоксилазы. Kahlson показал, что практически все ткани способны к образованию гистамина. В ряде работ продемонстрировано ускорение синтеза гистамина вследствие воспалительных реакций на физические, химические и бактериальные стимулы. Таким образом, синтез гистамина и его выделение из преформированных хранилищ вносят вклад в пул медиатора при воспалительной реакции.

Ферменты, осуществляющие катаболизм гистамина, -диаминоксидаза и метилтрансфераза неспецифичны для гистамина и широко распространены в тканях. Поэтому критерий существования специфической системы терминации действия гистамина неприменим для оценки его медиаторной функции, однако необходимые ферменты определенно доступны.

Для выяснения роли гистамина был использован интересный, но не дающий окончательного решения подход с применением конкурентных антагонистов. Первые мощные антагонисты гистамина (называемые теперь Н1-антагонистами) эффективны *in vitro* в препаратах изолированных гладких мышц. Антагонисты частично подавляют эффекты экзогенного гистамина у животных. Vain показал, что антигистаминные препараты уменьшают кожные реакции на введенный гистамин у человека. Однако те же препараты в основном неэффективны в экспериментальных моделях воспаления, а также при воспалительных и аллергических заболеваниях человека.

Одним из безусловных заключений, сделан

ных на основании этих наблюдений, является отрицание гистамина как медиатора острой воспалительной или аллергической реакции. Но такое заключение трудно было поддержать с учетом остальных данных, приведенных выше и имеющих явно противоположную направленность. Поэтому были приведены другие объяснения и выдвинуто предположение, что

гистамин, выделяясь локально (в месте воспаления), достигает концентрации, которая может снимать эффекты клинически достижимых концентраций антигистаминных препаратов. Другим возможным объяснением является существование нескольких типов рецепторов гистамина, которые обладают разной чувствительностью к блокаде антагонистами. Это представляется вполне вероятным, поскольку индуцированная гистамином секреция кислоты в желудке полностью нечувствительна к антигистаминным препаратам. Возможно также, что гистамин, опосредуя некоторые проявления острого воспаления, не является чистым медиатором. Как мы увидим далее, элемент истины есть в каждом из этих предположений.

Исходя из наблюдений Schild в отношении резистентности к антигистаминным препаратам, вызванной гистамином секреции желудочной кислоты, Black разработал группу H_2 -антагонистов гистамина, которые подавляют эту секрецию. Таким образом, был открыт путь к исследованию значения H_1 - и H_2 -рецепторов в воспалительных и иммунных реакциях.

Экспериментальная работа, выполненная в последнее десятилетие, скорее осложнила наше понимание этого вопроса, нежели внесла в него какую-то ясность. Не вызывает особых сомнений то, что классические воспалительные эффекты гистамина опосредуются H_1 -рецепторами. Однако вазодилатация, вызванная гистамином, сильнее подавляется H_2 -антагонистами в присутствии H_2 -антагонистов, что предположительно способствует действию H_2 рецепторов. Не исключается также небольшой H_2 -эффект в дополнение к выраженному - эффекту при вызванном гистамином повышении венозной проницаемости; H_2 -рецепторы, по-видимому, участвуют и в возникновении зуда, вызванного гистамином. Однако комбинация H_1 и H_2 -антагонистов не обеспечивает существенно большей эффективности лечения при гиперсенсибильности немедленного типа и воспалительных заболеваниях в сравнении с применением только H_1 -антагониста, эффективность которого, как уже отмечалось, лишь несколько выше маргинальной. Исключе-

ние из этого правила составляют некоторые воспалительные заболевания кожи. При различных формах крапивницы и атопическом дерматите уровень гистамина в крови, оттекающей из области поражения, повышается. Эти заболевания чувствительны к H_1 -антагонистам и в большей степени - к комбинации H_1 - и H_2 -антагонистов.

В недавних исследованиях была показана возможность существования третьего класса гистаминовых рецепторов, названных H_3 -рецепторами, и описаны специфические антагонисты для этих рецепторов. Однако участие этого предполагаемого H_3 -рецептора в гиперсенсибильности и воспалительных реакциях пока не определено.

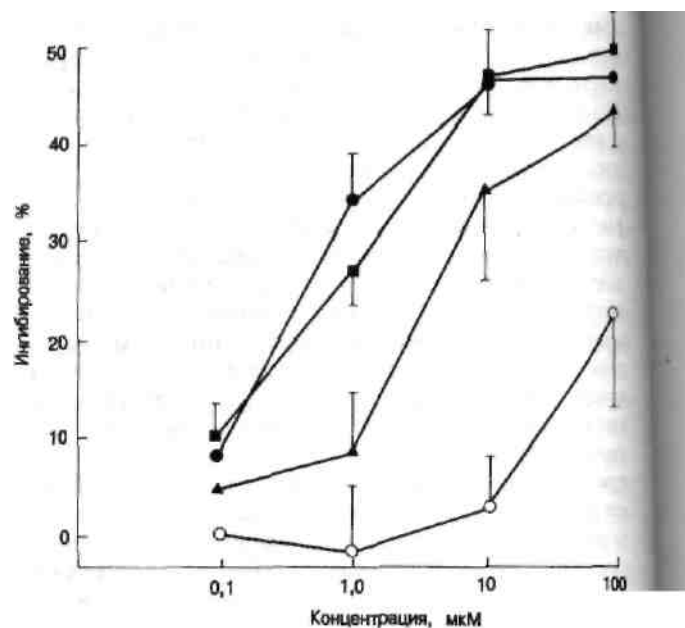
Таким образом, значительная часть представленных данных соответствует критериям, позволяющим признать гистамин медиатором воспалительных реакций и повышенной чувствительности немедленного типа. Но, как это следует из изложенного выше (и будет еще более очевидным в следующих главах этой части), гистамин является не единственным медиатором данных реакций. Постулат Dale о выделении одним нервом только одного передатчика в настоящее время пересматривается, а возможность существования нескольких передатчиков в одном нейроне делает трудной эволюцию предполагаемых передатчиков. В случае медиации аллергии и острого воспаления ситуация еще сложнее.

Гистамин как регулятор

Оценка роли гистамина еще больше усложнилась недавними исследованиями, показавшими, что гистамин, помимо его действия как медиатора, осуществляет функцию регулятора. Как свидетельствуют многочисленные исследования *in vitro*, гистамин изменяет реакции различных клеток на другие медиаторы, а также на воспалительные и иммунные стимулы. В некоторых из этих работ отмечается регуляторная провоспалительная активность гистамина, однако данные большинства исследований указывают на наличие противовоспалительных и(или) иммуносупрессивных эффектов. В целом установлено, что первый эффект связан с действием на H_1 -рецепторы, а второй - на рецепторы H_2 . Во многих публикациях такие выводы основываются на экспериментах, в которых эффект гистамина (нередко только в одной концентрации) подавляется H_1 - или H_2 -ан-

Рис. 43. Подавление аналогами гистамина стимуляции лимфоцитов конканавалином-А (25 мкг/мл^{-1}) у морских свинок.

Кривая с темными кружками - гистамин, с квадратами - 4-метилгистамин, с треугольниками - 2-метилгистамин, со светлыми кружками - 3-метилгистамин. Каждая точка представляет среднее значение и стандартную ошибку 12 двойных образцов в трех экспериментах. Результаты выражены в процентах подавления включения $[^3\text{H}]$ -тимидина в лимфоциты, стимулированные одним митогеном. N. В. Оценка H_2 -антагонистов в данном тесте невозможна, поскольку они сами обладают прямыми эффектами [Beets, Dale-Br. J. Pharmacol., 1979, 66, 365].



тагонистами (также взятыми в одной, достаточно высокой концентрации, обычно 10^{-4} - 10^{-3} М). Подобные результаты могут служить лишь грубым указанием на участие рецепторов; с фармакологической же точки зрения здесь требуются дополнительные количественные исследования. Прежде всего необходимо установить четкую зависимость доза - эффект для специфических агонистов с определением порядка величин, например импримидин > гистамин > димеприт или 4-метилгистамин >> 2-метилгистамин для H_2 -эффектов и гистамин > 2-тиазолилэтиламин > 2-метилгистамин > 2-пиридилэтиламин - для H_1 -эффектов (рис. 43). Но для более точного определения типа рецепторов (H_1 или H_2 , или ни тот, ни другой) необходимо выявить селективный эффект специфического конкурентного антагониста, включая параллельность кривых доза-эффект для гистамина или соответствующего агониста, что позволяет вычислить значение K_D , основанное (если возможно) на построении графика Шилда¹. Хотя эксперименты, необхо-

димые для определения константы диссоциации конкурентного антагониста регуляторного действия гистамина, часто включают измерение подавления ингибирования и достаточно трудны в выполнении, они тем не менее возможны и дают полезные результаты (рис. 44).

Расчет на более точные исследования рецепторов - вовсе не проявление педантичности. Поскольку полученная в них информация будет иметь важное значение не только для понимания биологической роли гистамина, но и для разработки новых лекарств на основе возможных регуляторов эффектов.

Следующим важным моментом интерпретации значимости полученных результатов является соответствие между изменениями ответа эффекторных клеток при различных концентрациях гистамина и условиями, достижимыми *in vivo*. Интересно, что концентрация гистамина в одной грануле крысиных тучных клеток достигает почти молярных значений, а локальная концентрация гистамина в ткани после секреции тучных клеток может составлять 10^{-1} - 10^{-3} М, хотя вряд ли столь высокие концентрации распространяются на большие расстояния и сохраняются длительное время. Тем не менее небольшой процент изменений эффекта при очень высоких концентрациях гистамина свидетельствует не в пользу серьезной значимости гистамина *in vivo*.

¹ График Шилда - график $\log(A/a) - 1$ против $\log I$, где A/a - отношение концентраций агониста, которые вызывают 50% максимального эффекта с агонистом (A) и без него (a), а I - концентрация антагониста. Наклон линии должен быть одинаковым при простом конкурентном антагонизме).

Все это следует учитывать при оценке исследований *in vitro* возможной регуляторной роли гистамина.

Противовоспалительное регуляторное действие

В некоторых опубликованных работах сообщается о стимулирующем или противовоспалительном действии гистамина на эозинофилы: усиление хемотаксиса при концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М, увеличение экспрессии СЗБ- и С4-рецепторов и увеличение гибели шистосомул. Предполагается участие Н₁-рецепторов, однако окончательная идентификация не проведена.

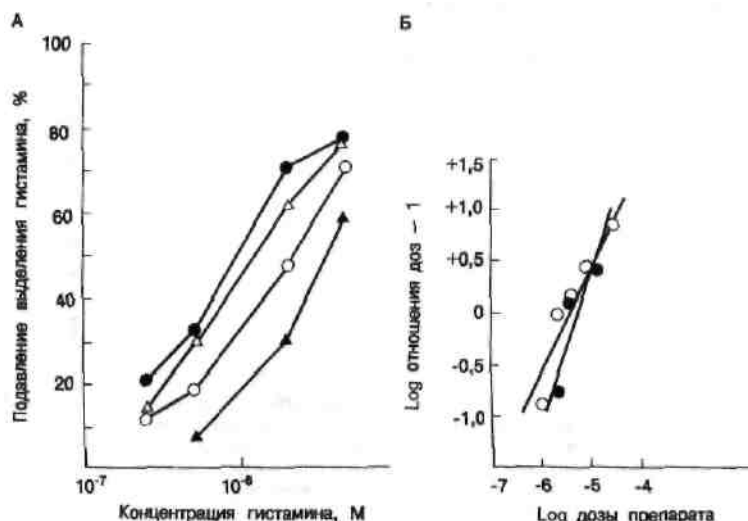
Противовоспалительное и иммуносупрессивное регуляторное действие

Многие исследования свидетельствуют об ингибиторном эффекте гистамина. Гистамин при концентрации 10^{-7} - 10^{-5} М, как сообщается, уменьшает выделение гистамина из человеческих базофилов, действуя на Н₂-рецепторы, и приведенные доказательства достаточно убедительны, как это видно на рис. 44 (хотя более высокое дозовое отношение было бы еще более убедительным). Гистамин также уменьшает хемотаксис базофилов человека. Существуют противоречивые данные о прямом значительном влиянии гистамина на активность нейтрофилов и малоубедительные результаты его действия на макрофаги. В отношении лимфоцитов отмечается четко определенное действие

у мышей на Н₂-рецепторы и умеренное подавление Т-клеточной цитотоксичности, направленной против аллогенных клеток. По крайней мере в 10 исследованиях показано подавление гистамином пролиферации Т-лимфоцитов у морских свинок, мышей и человека. В большинстве из них выявлен умеренный эффект при высоких концентрациях (10^{-4} - 10^{-3} М), хотя в условиях специального определения заметные эффекты наблюдаются при низких концентрациях (10^{-10} - 10^{-7} М). Приведены данные как в пользу, так и против участия Н₂-рецепторов в этих реакциях. По некоторым данным, наблюдаемые эффекты связаны с активацией супрессорных клеток.

В некоторых экспериментальных исследованиях влияния гистамина на легкие возник вопрос, насколько индуцированный гистамином бронхоспазм, опосредуемый Н₁-рецепторами, модулируется индуцированной гистамином релаксацией, опосредуемой Н₂-рецепторами. В легких морских свинок сокращение гладких мышц, вызываемое селективным Н₁-агонистом 2-пиридилэтиламином, отменяется Н₂-агонистом димапритом (рис. 45). Эффект димаприта может быть заблокирован некоторыми конкурентными Н₂-антагонистами, значение рА₂ для которых свидетельствует об опосредовании Н₂-рецепторами релаксации, вызванной димапритом. Так как указанные эксперименты выполнялись на паренхиматозных полосках, то вполне возможно, что часть Н₂-агонистических эффектов обусловлена известным Н₂-вазодилаторным действием на

Рис. 44. А- кривые доза- эффект для подавления гистамином антигениндуцированного выделения гистамина (одного и в присутствии указанных концентраций буримамида). Кривая с темными кружками - гистамин, со светлыми треугольниками - гистамин и $2,1 \cdot 10^{-6}$ М буримамида, со светлыми кружками - гистамин и $4,3 \cdot 10^{-6}$ М буримамида, с темными треугольниками - гистамин и $1,1 \cdot 10^{-5}$ М буримамида. Б-график Шилда, основанный на данных графика А и других сходных экспериментов. Темные кружки - буримамид $K_d = 5 \cdot 10^{-6}$ М, светлые кружки - буримамид $K_d = 3,9 \cdot 10^{-6}$ М. Полученные значения K_d обычно близки к таковым в других системах с Н₂-рецепторами, например в предсердии морских свинок [Lichtenstein, Gillespie — J.Pharmacol. Exp. Ther., 1975, 192, 441].



легочные кровеносные сосуды. Наличие H_2 -рецепторов в легких морских свинок было подтверждено в исследовании связывания (см. ниже). Показано также потенцирование H_2 -антагонистами бронхоспазма, вызванного гистамином в изолированных бронхах человека. Однако H_2 -антагонисты не влияют на бронхоспазм, вызванный антигеном. В ряде исследований не удалось показать бронхорасширяющий эффект гистамина, но эти эксперименты могут быть подвергнуты критике за недостаточно широкий диапазон доз препарата. Вообще, как нам кажется, опосредованный H_2 -рецепторами бронхорасширяющий эффект гистамина, который наблюдается у морских свинок, у человека слишком мал и не имеет существенного значения при астме.

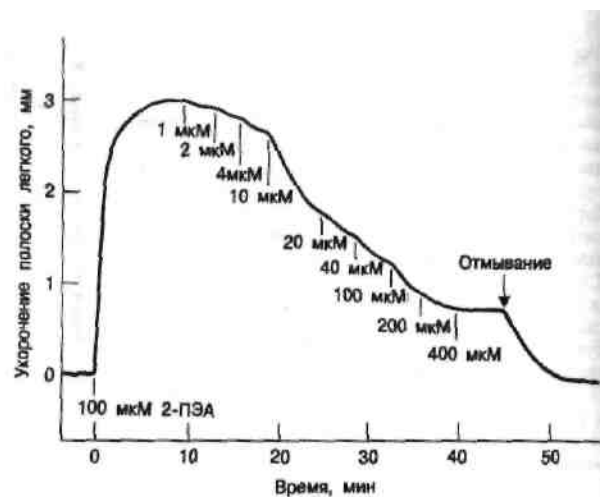
Возможно, необходимо принять во внимание, что ингибиторный эффект гистамина может быть обусловлен предполагаемыми H_3 -рецепторами. Заявлено существование таких рецепторов на гистаминергических нервах, оканчивающихся в ткани головного мозга. Они контролируют синтез и выделение гистамина. Получены доказательства, что стимуляция H_3 -рецепторов уменьшает синтез и выделение гистамина в легких, селезенке и коже крыс. Предполагается также присутствие H_3 -рецепторов на тучных клетках, где они модулируют выделение гистамина.

Получение убедительных доказательств существования H_3 -рецепторов позволит объяснить некоторые противоречия относительно регуляторной роли гистамина в иммунном ответе, поскольку импримидин, мощный агонист H_2 -рецепторов, является не менее мощным антагонистом H_3 -рецепторов.

Исследования связывания меченого гистамина с различными типами клеток не слишком способствовали пониманию рецепторов, так как в них определялись главным образом захват клеткой и(или) его катаболизм. Изучение связывания высокоспецифичных меченых H_1 и H_2 -антагонистов и возможных H_3 -антагонистов с высокой активностью может дать больше информации о типах гистаминовых рецепторов на различных клетках воспаления, хотя даже присутствие рецептора к лиганду не обязательно означает наличие физиологического ответа клетки на лиганд. В дыхательных путях морских свинок связывание 3H -непирамина использовалось для идентификации H_2 -рецептора, опосредующего бронхоспазм, а связывание 3H -тиотидина для идентификации H_1 -рецептора. Насыщаемое специфическое связывание 3H -тиотидина легкими морских свинок (рис. 46) замещалось рядом H_2 -антагонистов. Значения K_D , полученные методами связывания, четко соответствуют величинам K_D , полученным при использовании антагонистов: а) для блокирования бронхорасширяющего действия гистамина (см. выше); б) для блокирования стимуляции гистамином аденилатциклазы легких у морских свинок. Таким образом, в легких морских свинок фармакологические и биохимические показатели совпадают с данными, полученными методами связывания с H_2 -рецепторами. Однако вопрос о локализации описанных выше H_2 -рецепторов на гладких мышцах дыхательных путей, на гладких мышцах сосудов, на тучных или каких-либо других клетках - остается открытым.

Гистамин, как было показано выше, широко распространен в организме и, вероятно,

Рис. 45. Кумулятивная кривая доза - ответ при релаксации полоски легкого морских свинок (сокращенной 100 мкМ 2-пиридилэтиламина, 2-ПЭА) под действием димаприта. Вертикальные линии и концентрации указывают на каждое добавление димаприта [Foreman, Rising, Webber- Br. J. Pharmacol., 1985, 86, 465-473].



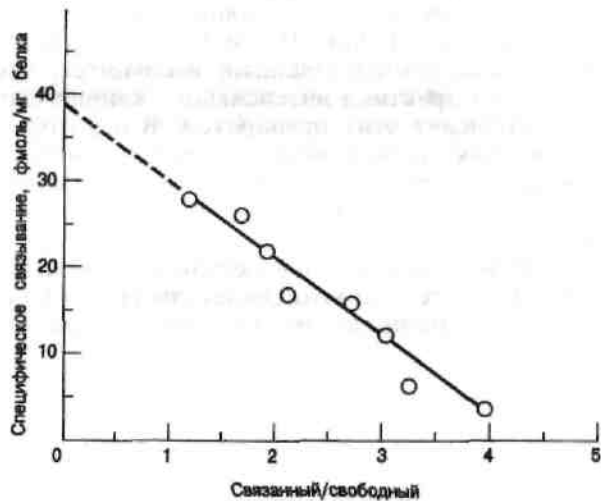
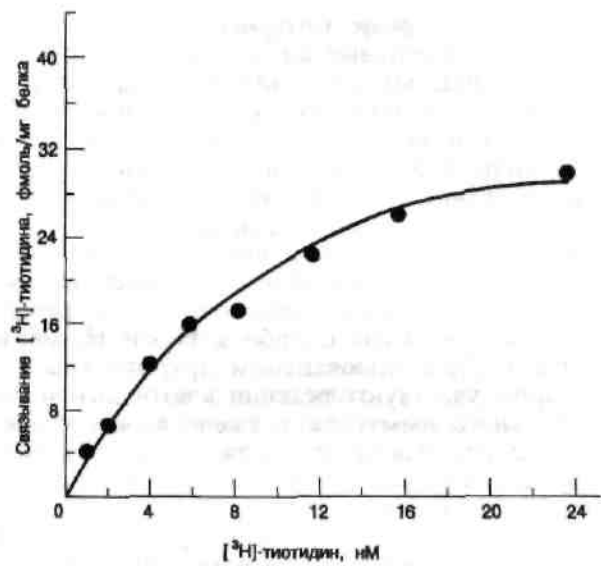


Рис. 46. Специфическое связывание H_2 -антагониста [3H]-тиотидина с гомогенатом легкого морских свинок и график Скетчарда для специфического связывания. $K_d = 8$ нМ; $B_{max} = 28$ фмоль/мг белка [Foreman, Norris, Rising, Webber.-Br. J. Pharmacol., 1985, 86, 475-482].

присутствует в любой ткани, для которой постулируется наличие его регуляторной активности, а также ферментов, необходимых для его образования и распада. Кроме того, при некоторых клеточно-опосредованных ответах наблюдается базофильная инфильтрация, причем базофилы, составляя 0,5-1% лейкоцитов крови, достигают 20-60% инфильтрирующих клеток. Большое количество базофилов и соответственно высокие концентрации гистамина определяются в особые фазы реакции на кожные аллотрансплантаты, на укусы клещами, на вирус коровьей оспы и контактные аллергены.

Такие реакции с высоким уровнем базофилов особенно характерны для морских свинок, но они могут наблюдаться и у человека. У морских свинок было показано местное увеличение содержания гистамина в коже при замедленной гиперсенситивности туберкулинового типа. Пока не ясно, какую роль при этом играет гистамин-медиатора или модулятора (или, возможно, обе роли).

Трудно определить, обладает ли гистамин *in vivo* регуляторной функцией при аллергии и воспалении. Частично это связано с тем, что его медиаторная роль может осложнять ре-

зультаты; и, кроме того, некоторые специфические гистаминовые антагонисты (например, H₂-антагонисты) могут подавлять катаболизм гистамина и действовать, как H₂-агонисты импромидин и димаприт. Тем не менее введение гистамина или других специфических H₂-агонистов может ослаблять реакции повышенной чувствительности замедленного типа у морских свинок, если оно осуществляется в индуктивную фазу реакции. В разных исследованиях эти эффекты относят либо только к H₂-рецепторным механизмам, либо к H₁- и \wedge -механизмам. При адьювантном артрите крыс, в котором участвуют реакции клеточного и гуморального иммунитета, ежедневное подкожное введение гистамина дважды в день в диапазоне доз 0,3- 10 мг/кг вызывает дозозависимое уменьшение первичных и вторичных поражений. Тем не менее в данном исследовании нельзя исключить активации гипофизарно-адреналовой системы. Возможно, более важным является отсутствие явных свидетельств критического влияния H₁ и H₂-антагонистов на клеточно-опосредованный иммунитет, что следует из практики интенсивного клинического применения этих препаратов. В некоторых публикациях сообщалось об иммуностимулирующем эффекте циметидина, хотя не вполне ясно, является ли это действие прямым или нет.

Таким образом, хотя результаты экспериментов *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о регуляторной роли гистамина, пока невозможно

предоставить доказательства, удовлетворяющие критериям фармакологического вмешательства действия агента, модифицирующего наблюдаемые феномены. Возможно, это связано с тем, что гистамин является лишь одним из многих регуляторов, или же с другим фактором, а именно: его регуляторная активность опосредуется рецепторами, для которых еще не найдено адекватных антагонистов. Поэтому с большим интересом ожидаются результаты исследований новых H₃-агонистов и антагонистов.

Заключение

Совершенно очевидно, что гистамин является лишь одним из многих медиаторов реакций, рассмотренных в данной главе, а его роль как регулятора наблюдаемых процессов пока не исследована адекватно и не оценена полностью.

Список литературы

- Owen D. A. A. & Woodward D.F. (1980) Histamine and histamine H₁ and H₂ receptor antagonists in acute inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* 8, 150.
- Paul M. & Lichtenstein L.M. (1982) Histamine and immune responses. In: Ganellin C. R. & Parsons M. E. (eds) *Pharmacology of Histamine Receptors*, p. 392, Wright PSG, Bristol.
- Hill S.J. (1987) Histamine receptors branch out. *Nature* 327, 104.

Простагландины и подобные им вещества, образующиеся из арахидоновой кислоты (см. ниже), являются этиологическими факторами в патогенезе многих заболеваний, включая воспаление и астму. Выделяют несколько групп эйкозаноидов, поэтому первая часть данной главы посвящена номенклатуре и структуре этих соединений. Их биосинтез рассматривается с учетом биологической активности, указывающей на их возможную медиаторную роль в ряде патофизиологических событий.

Номенклатура эйкозаноидов

Активные вещества, стимулирующие гладкие мышцы, были обнаружены в семейной жидкости человека 50 лет назад. Тогда исследователи полагали, что предстательная железа является главным источником данной активности, поэтому был введен термин «простагландины». Термин сохраняется и в настоящее время, хотя известно, что простагландины образуются большинством клеток организма, а предстательная железа не является их основным источником.

Простагландины - это группа окисленных жирных кислот, содержащих 20 углеродных атомов и циклопентановое кольцо между C8 и C12. Их считают производными гипотетического соединения протаноевой кислоты (рис. 47). Простагландины разделяют на классы (A-J) в зависимости от групп заместителей в циклопентановом кольце. Первой была определена структура простагландинов E и F. Такие обозначения были им даны исследователями из Karolinska Institutet в Стокгольме ввиду возможности их разделения в диэтиловом эфире и буфере. Простагландины F экстрагировались эфиром, а соединения F оставались в фосфатном (по-шведски-fosfat) буфере. Обработка простагландинов E кислотой или основанием превращает их в простагландины A или B соответственно.

Дальнейшая классификация простагландинов основывается на количестве двойных свя-

зей в боковых цепях, которое обозначается соответствующим индексом (например, в ПГЕ₂ две двойные связи) (рис. 48). Арахидоновая кислота (C20:4, *w*-6) превращается в бисеновые простагландины (т. е. содержащие две двойные связи); дигомо- γ -линоленовая (C20:3, *w*-6) и эйкозапентаеновая (C20:5, 3 ω -3) кислоты образуют соответственно моноеновые и триеновые серии простагландинов.

Простаглицлин (ПГ₁₂) обладает структурой, сходной с простагландинами, но содержит вторую кольцевую систему (см. рис. 47).

Тромбоксаны (ТОА и ТОВ) первоначально были идентифицированы как продукты метаболизма арахидоновой кислоты в тромбоцитах крови. Вместо циклопентанового кольца, характерного для структуры простагландинов, тромбоксаны содержат оксановое кольцо (см. рис. 48).

Простаноидами называют производные гипотетической протаноевой кислоты (т. е. простагландины, простаглицлин), и хотя, строго говоря, это не вполне корректно, тромбоксаны тоже включаются в данную группу.

Лейкотриены (ЛТ) получили свое название в связи с их первоначальным определением в лейкоцитах и наличием конъюгированной триеновой системы в их структуре. Лейкотриены не содержат ни циклопентанового, ни оксанового колец и разделяются на подгруппы (A - F) в соответствии с основными структурными различиями. Они также могут подразделяться по количеству двойных связей в боковых цепях; например, арахидоновая и эйкозапентаеновая кислоты могут превращаться в тетраеновые и пентаеновые лейкотриены (например, ЛТВ₄ и ЛТВ₅) соответственно. Структура лейкотриенов, образованных из арахидоновой кислоты, будет показана ниже, на рис. 53.

Эйкозаноиды. Этот термин используется для обозначения всех 20 углеродных жирных кислот, т. е. простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов, а также их предшественников.

Биосинтез и метаболизм эйкозаноидов

Доступность предшественников жирных кислот

Арахидоновая и другие кислоты, которые служат субстратом для превращения в простагландины, поступают непосредственно с пищей или образуются при удлинении цепей и ненасыщении других жирных кислот. Например, арахидоновая и эйкозапентаеновая кислоты могут образовываться из линолевой (C 18:2 *co*-6) и линоленовой (C 18:3, *co*-3) кислот соответственно. Однако эти превращения не имеют важного значения у человека; следовательно, арахидоновая и эйкозапентаеновая кислоты обычно поступают в организм непосредственно с пищей. Мясо животных является богатым источником арахидоновой кислоты, а морская рыба содержит относительно большие количества эйкозапентаеновой кислоты.

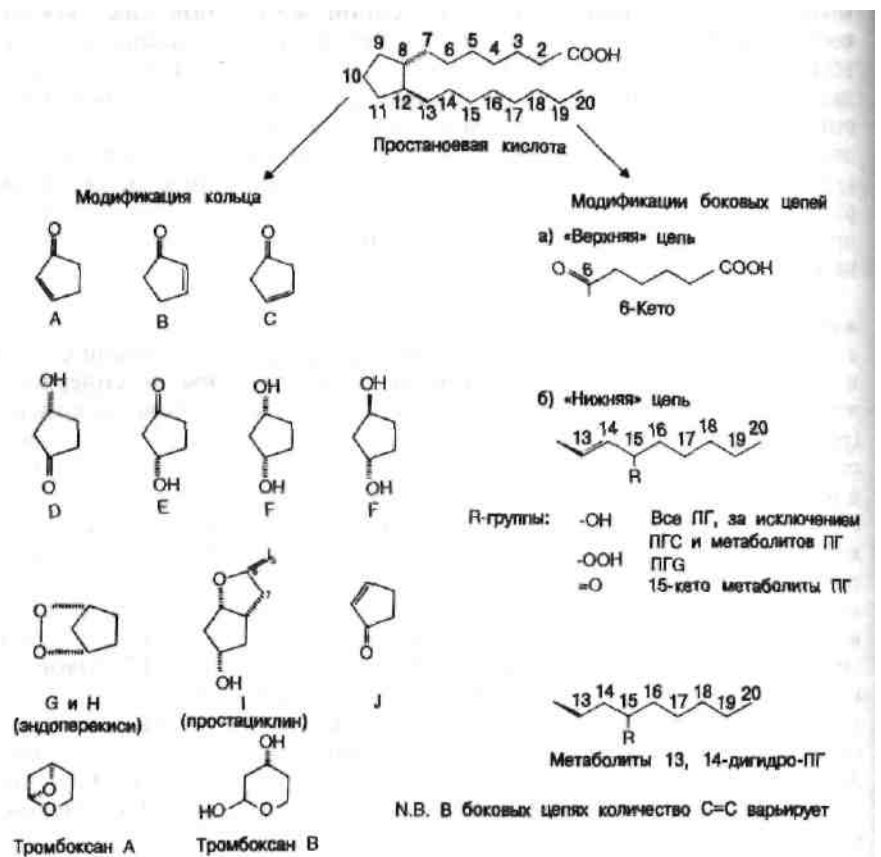
Содержание свободных жирных кислот

(в частности, арахидоновой) в клетках достаточно низкое, но сравнительно большое их количество находится в этерифицированной форме. Главным источником арахидоновой кислоты служат фосфолипиды, представляющие собой важный структурный компонент клеточных мембран. Депо жиров (например, адипозная ткань, богатая триглицеридами) относятся к менее важным источникам арахидоновой кислоты для превращения в простагландины, тромбоксаны и лейкотриены.

Арахидоновая кислота первично этерифицируется в 2'-ацильной позиции фосфолипидов (рис. 49). Так как для последующих ферментных реакций образования эйкозаноидов необходима свободная арахидоновая кислота, начальной реакцией бывает высвобождение жирной кислоты из мембранных фосфолипидов. Эта реакция является этапом, лимитирующим скорость биосинтеза эйкозаноидов. Фосфолипазу A₂ (ФЛА₂) относят к главным ферментам, участвующим в выделении свободных кислот, однако необходимо учитывать и дру-

Рис. 47. Химическая структура простагландинов, простаглицлина и тромбоксанов.

Простагландины могут рассматриваться как производные гипотетической простановой кислоты с модификациями циклопентанового кольца и боковых цепей, что показано на рисунке. Простаноиды также разделяются на группы в зависимости от количества двойных связей в боковых цепях (см. рис. 48).



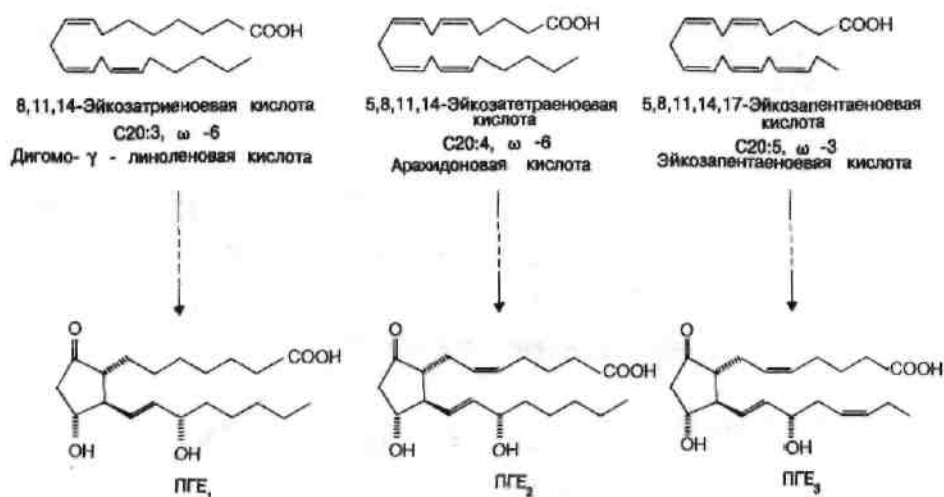


Рис. 48. Образование моно-, ди- и триеновых простагландинов из полиненасыщенных жирных кислот. Превращение жирных кислот в соответствующие простагландины осуществляется в ходе нескольких ферментативных реакций (см. рис. 51 и 52).

гие механизмы, например комбинированное действие ФЛС и диглицериллипазы.

В нормальных (базальных) условиях ФЛА₂ неактивна, поскольку она связана с ингибиторным белком, например с липокортином (см. главу 24), и активируется под действием различных стимулов-гуморальных, нервных, иммунных и механических (рис. 50), которые вызывают диссоциацию этого комплекса. Фосфолипаза А₂ непосредственно выделяет арахидоновую кислоту из фосфолипидов (см. рис. 50). Вся активность фермента ФЛА₂, за исключением лизосомной фракции, кальций-зависима, а оптимальная скорость реакции отмечается при нейтральных значениях pH. Большинство ферментов ФЛА₂ связано с мембраной, поэтому мембранные фосфолипиды представляют как окружение, так и субстрат для фермента. Структурная композиция фосфолипидов и ФЛА₂ в мембране оказывает существенное влияние на ферментативную реакцию, и любое событие, разрушающее мембранный фосфолипидный бислой, повышает фосфолипазную активность.

Хотя ФЛА₂ действует на разные фосфолипиды (т.е. содержащие разные основания), главным источником выделяющейся арахидоновой кислоты являются фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин. Убедительные доказательства существования специфических арахидоновых фосфолипаз отсутствуют. Лизо-

фосфолипид (например, лизофосфатидилхолин), образующийся после отщепления арахидоновой кислоты, обычно быстро реагирует с КоА-зависимой ацилтрансферазой.

Фосфолипаза А₂ также имеет важное значение для образования фактора активации тромбоцитов, который является важным медиатором при некоторых патологических состояниях (см. главу 16).

Последующие пути превращения выделенной арахидоновой кислоты были показаны, в частности, у тромбоцитов. Фосфатидилинозитол гидролизует специфической фосфолипазой С, а образующийся диглицерол служит субстратом для липазы, расщепляющей арахидоновую кислоту (см. рис. 50). Фосфоинозитолы, первоначально образующиеся под действием фосфолипазы С, могут быть передатчиками, контролирующими мобилизацию внутриклеточного кальция. Накапливаются данные, указывающие на возможность важной роли фосфоинозитолов во внутриклеточной передаче сигналов. Диглицерол после быстрого фосфорилирования превращается в фосфатидиловую кислоту, а затем в фосфатидилинозитол. Этот повторный цикл называется обменным циклом фосфатидилинозитола. Существуют данные об образовании арахидоновой кислоты из фосфатидиловой кислоты под действием специфической ФЛА₂.

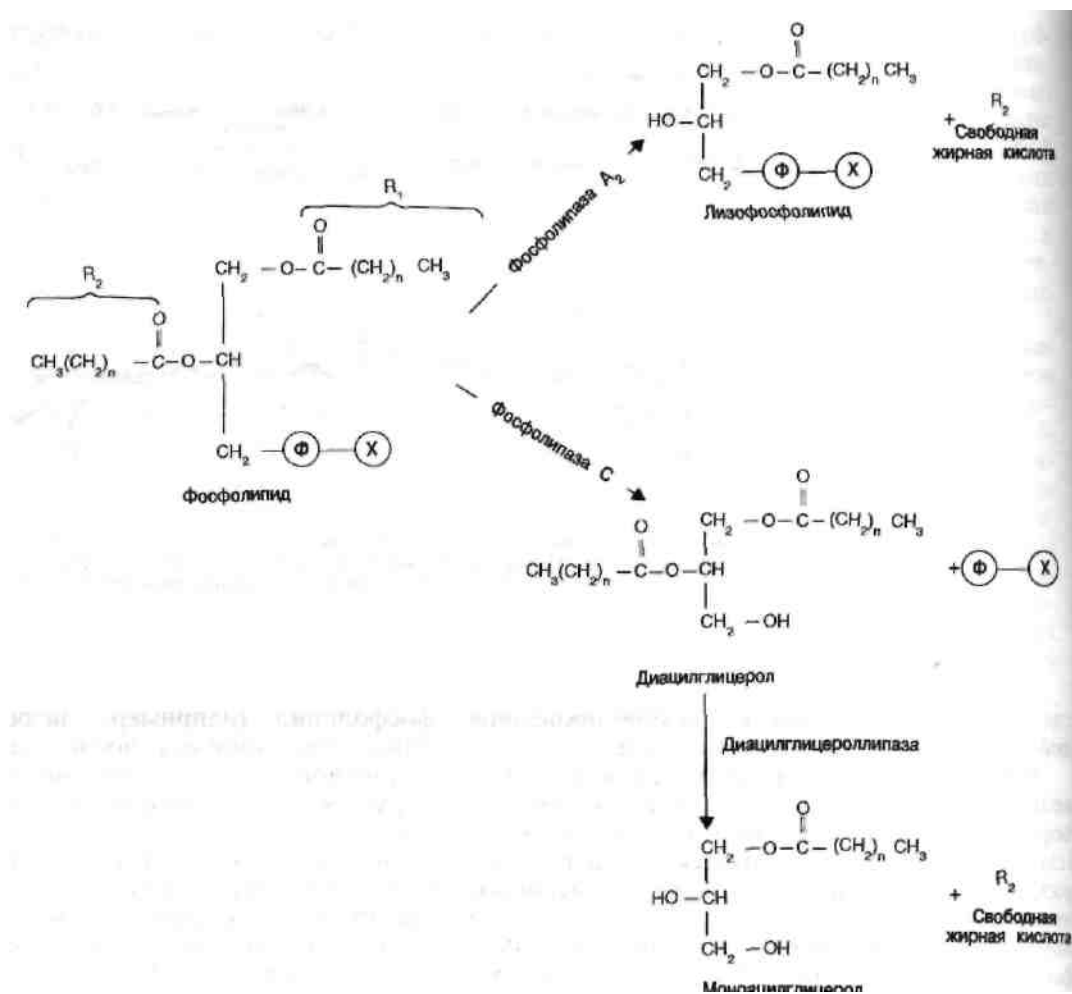


Рис. 49. Ферментативное выделение ненасыщенных жирных кислот из фосфолипидов.

R_1 и R_2 -жирные кислоты, связанные с глицеролом; R_1 безвариантно является насыщенной жирной кислотой (например, стеариновой, пальмитиновой), а предшественник простагландинов (например, арахидоновая кислота) обозначен R_2 . Ф-фосфатная группа; Х-основание (например, холин, этаноламин, серин). Фосфолипаза С специфически действует на фосфатидинозитол (т. е. Х является инозитолом).

Синтез простагландинов

Простагландины и другие метаболиты арахидоновой кислоты в тканях не депонируются, поэтому их биосинтез должен непосредственно предшествовать их выделению. Как уже отмечалось в предыдущих разделах главы, выделение кислоты-предшественника из фосфолипидного депо является исходным этапом, лимитирующим скорость образования продукта. Свободная арахидоновая кислота в результате согласованных реакций может метаболи-

зироваться циклооксигеназой жирных кислот (простагландинсинтетазой) в простагландиновые эндоперекиси (ПГ G_2 и ПГ H_2). Первым этапом реакции является стереоспецифическое удаление водорода при С13 с последующим выделением кислорода и образованием 11-перокси-5,8,12,14-эйкозатетраеновой кислоты. Дальнейшее окисление при С15, изомеризация A^{13} -двойной связи и циклизация путем образования новой С—С-связи между С8 и С12 приводит к образованию ПГ G_2 . Восстановление группы 15-перокси в данной эндоперекиси

с помощью пероксидазы, сопряженной с циклооксигеназой, дает ПГН₂ (рис. 51).

Циклооксигеназа обнаруживается в большинстве клеток млекопитающих; только эритроциты лишены этого фермента. Субклеточная локализация циклооксигеназы связана с микросомной фракцией эндоплазматической сети; она представляет собой гемзависимый гликопротеин. Ферментативная реакция стимулируется небольшими количествами перекисей («перекись-затравка»), а избыток перекиси инактивирует фермент. Так как во время образования ПГН₂ генерируются перекисные радикалы, фермент сам себя разрушает (или совершает «самоубийство»). Для циклооксигеназы предпочтительным субстратом является арахидоновая кислота, однако дигомо-у-линоленовая и (в меньшей степени) эйкозапентаеновая кислоты могут превращаться в простагландины (см. рис. 48).

Эндоперекиси (ПГГ₂, ПГН₂), лабильные при физиологических значениях pH и температуры, являются центральными молекулами в биосинтезе ряда других арахидоновых метаболитов; они ферментативно или неферментативно превращаются в простагландин (ПП₂), ТОА₂, «первичные» простагландины (ПГЕ₂, ПГФ_{2a}, ПГД₂), 17-окси-гептадекатриеновую кислоту и малондальдегид (рис. 52). Образование метаболитов зависит от типа клеток: например, эндоперекиси в тромбоцитах превращаются почти исключительно в ТОА₂, а в сосудистом эндотелии-в простагландин. Простагландин и ТОА₂ образуются из ПГН₂ только ферментативно (контролируются соответствующими синтетазами). Первичные проста-

гландины могут образовываться неферментативно, но существуют специфические изомеразы, которые катализируют превращение ПГН₂ в ПГЕ₂ и ПГД₂.

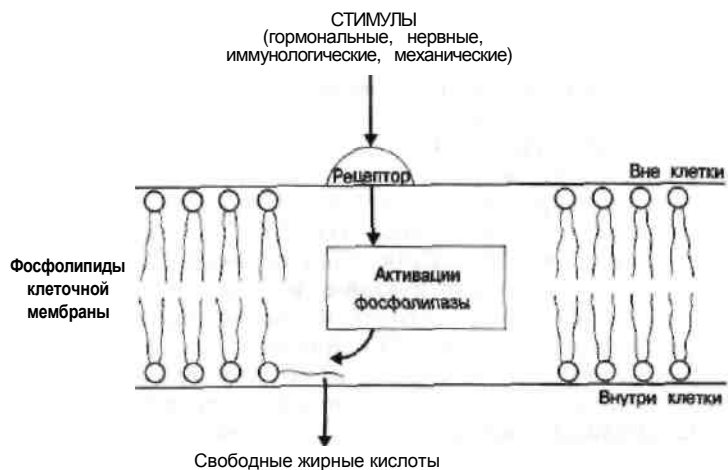
Простагландины и ТОА₂ нестабильны при физиологических значениях pH и температуры (период полураспада - примерно 5 мин и 30 с соответственно); они гидролизуются в менее активные 6-кето-ПГЕ_{1a} и ТОВ₂ соответственно (см. рис. 52).

Метаболизм простагландинов и тромбоксанов

Метаболизм простагландинов в организме происходит быстро. Время их биологической полужизни составляет менее 1 мин, и в нормальной плазме концентрация родительских простагландинов не превышает 100 пкг/мл. Первоначальная метаболическая реакция заключается в окислении группы 15-окси с последующим восстановлением 13,14-диена. Оба процесса катализируются специфическими ферментами- простагландин-15-оксидегидрогеназой и простагландин-А¹³-редуктазой соответственно. Большинство клеток содержит эти растворимые ферменты, но особенно богаты ими почки и (еще больше) легкие. Например, 90% инфузируемых ПГЕ₁, Е₂ или F_{2a} метаболизируются после единственного прохождения через перфузируемые легкие. В то же время метаболизм зависит и от активного захвата. Ряд простагландинов, в частности простагландин, является плохим субстратом для механизма захвата и вследствие этого «выживает» при прохождении через легкие. Несмотря на это,

Рис. 50. Схематическое изображение процессов, ведущих к выделению свободных жирных кислот (например, арахидоновой кислоты) из мембранных фосфолипидов клетки

Стимул взаимодействует с рецептором, что приводит к активации фосфолипазы, которая катализирует выделение жирных кислот в результате процесса, показанного на рис. 49.



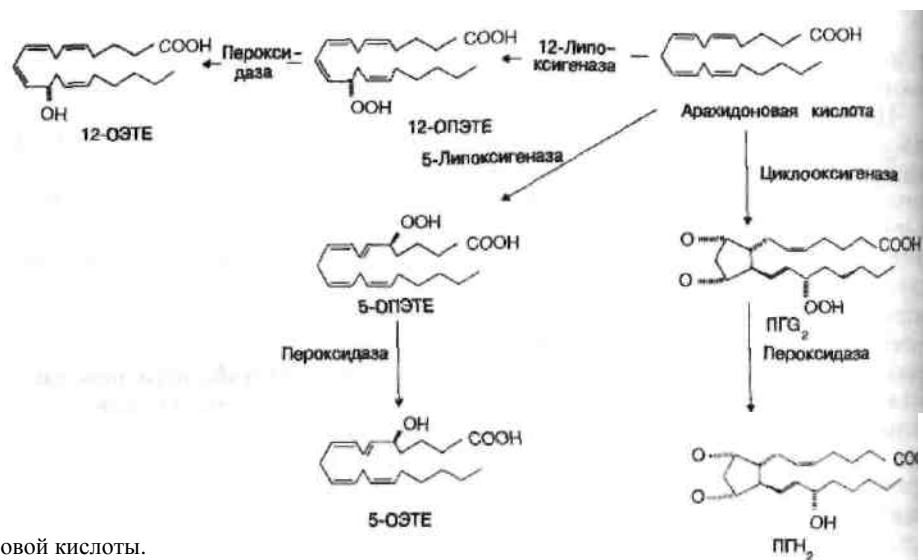


Рис. 51. Метаболизм арахидоновой кислоты.

простаглин *in vivo* является короткоживущим.

Концентрация первых метаболитов простагландинов (производные 15-кето и 13,14-дигидро-15-кето) в плазме обычно выше, чем концентрация родительских простагландинов, но биологическая активность метаболитов заметно ниже. Дальнейшее их окисление происходит на «верхней» и «нижней» боковых цепях (*B*- и *w*-окисление соответственно) преимущественно в печени. Окончательно ди-нор и тетра-нор (т. е. удаление двух и четырех углеродов из «верхней» боковой цепочки) метаболиты 20-окси и 20-карбокси легко выделяются с мочой.

Образование гидропероксикислот и лейкотриенов

Вторым (позже обнаруженным) путем арахидонового метаболизма является окисление, контролируемое липоксигеназными ферментами. Свободные жирные кислоты превращаются в гидроперокси-производные (гидропероксидэйкозатетраеновые кислоты, ГПЭТЕ), которые легко восстанавливаются пероксидазой глутатиона в соответствующие гидроксикислоты (ГОЭТЕ). В животном и растительном мире существует несколько липоксигеназ, которые катализируют окисление молекулярным кислородом *cis,cis*-1,4-пентадиеновые системы. Так, арахидоновая кислота может метаболизироваться этими ферментами до нескольких

изомеров ГПЭТЕ. В отличие от циклооксигеназы, которая сравнительно специфически действует на арахидоновую кислоту, липоксигеназы могут эффективно катализировать окисление других жирных кислот, включая эйкозатриеновые и эйкозапентаеновые кислоты.

Впервые липоксигенация арахидоновой кислоты в тканях млекопитающих была описана в тромбоцитах; в результате этого процесса образуется 12-ГОЭТЕ (см. рис. 51). Однако более интересным является образование 5-ГОЭТЕ, поскольку она является промежуточным продуктом при генерировании лейкотриенов.

В то время как циклооксигеназа широко распространена в клетках млекопитающих, 5-липоксигеназа ограничена главным образом нейтрофилами, эозинофилами, моноцитами, макрофагами и тучными клетками. Эти клетки образуются в костном мозге, возможно, из общей стволовой клетки. Все эти клетки участвуют в воспалительных реакциях, и наличие общего фермента (5-липоксигеназы) может иметь функциональное значение. Кроме того, 5-липоксигеназа обнаружена в кератиноцитах, кровеносных сосудах и в головном мозге.

Другое различие между циклооксигеназой и 5-липоксигеназой заключается в избирательной активации последнего фермента кальцием (например, кальциевый ионофор A23187 сильно и избирательно стимулирует биосинтез 5-липоксигеназных продуктов). Напротив, циклооксигеназа всегда находится в активном со-

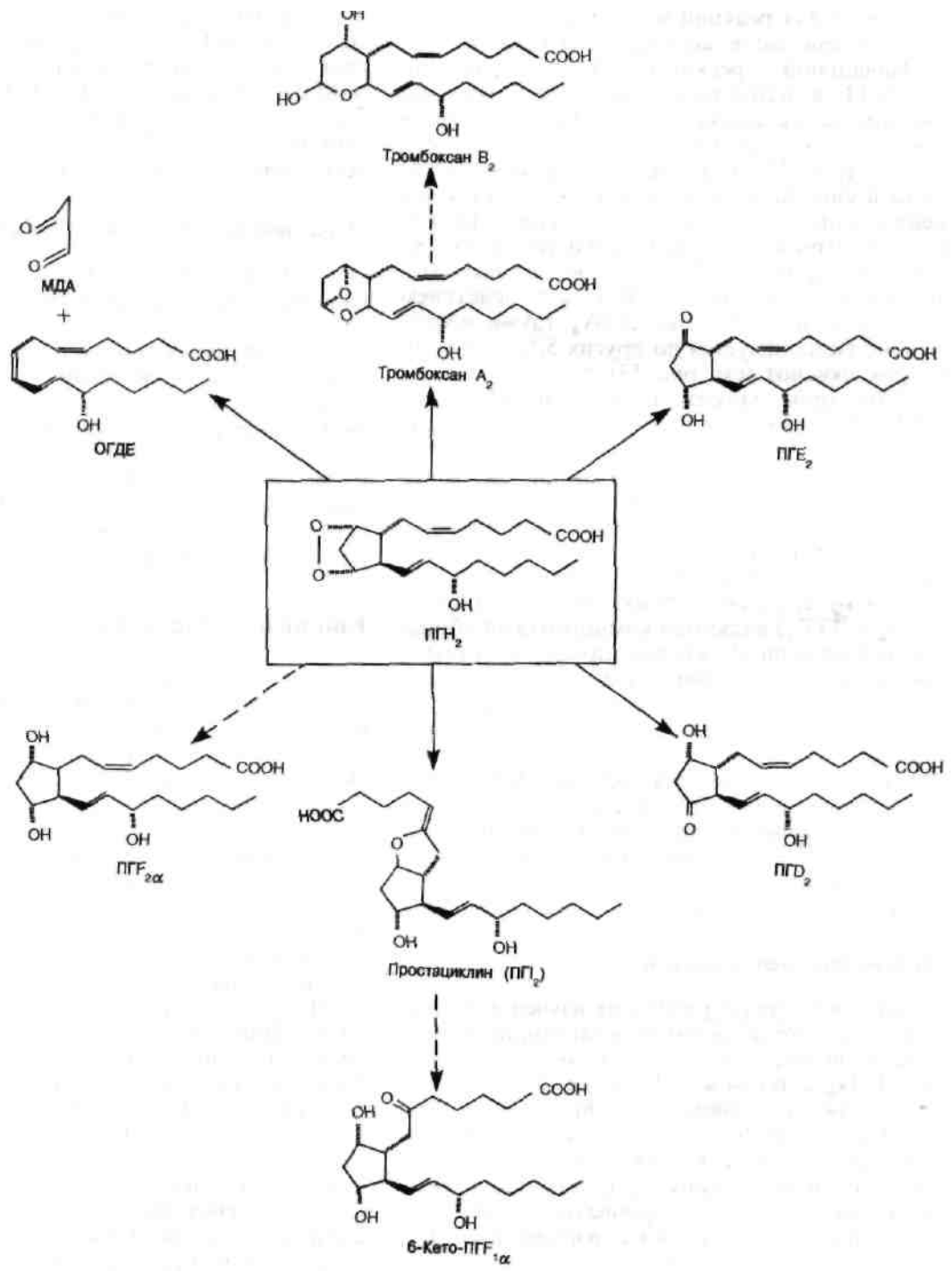


Рис. 52. Превращение простагландиновой эндоперекиси (ПГН₂) в простагландины, простациклин и тромбоксаны.

стоянии и для реакции необходимы лишь субстрат и небольшое количество перекиси.

Начальной реакцией в превращении 5-ГПЭТЕ в лейкотриены является потеря воды, которая катализируется дегидразой, с формированием нестабильного 5,6-эпоксида (ЛТА₄) (рис. 53). Как и в случае с эндоперекисями в синтезе простагландинов, ЛТА₄ является центральным соединением в образовании других лейкотриенов. ЛТА₄ гидролизуется до 5(S), 12(R)-дигидрокси-6,14-cis-8, 10-trans-эйкозатетраеновой кислоты (ЛТВ₄) под действием растворимой гидролазы. ЛТА₄ также неферментно гидролизуется до других 5,12- и 5,6-дигидроксикислот (см. рис. 53).

Глутатион может взаимодействовать с ЛТА₄. Реакция катализируется специфической глутатион-Б-трансферазой, при этом образуется 5(8)гидрокси-6(К)-8-глутатионил-7,9-trans-11,14-cis-эйкозатетраеновая кислота (ЛТС₄). Данный лейкотриен может метаболизироваться у-глутамилтранспептидазой и цистеинглициназой до LTD₄ и LTE₄ соответственно. Эти пептидно-липидные лейкотриены (ЛТС₄, LTD₄ и LTE₄) являются компонентами «бронхоконстрикторной активности», генерируемой при анафилаксии; она была описана 50 лет назад, и фармакологи называли ее «медленно действующим веществом анафилаксии» (МДВ-А). Другой лейкотриен, ЛТФ₄, был идентифицирован как 5(8)-гидрокси-6(R)-цистеинилглутамиловый аналог ЛТС₄.

Разные лейкотриены, как и простагландины, образуются специфическими типами клеток; например, эозинофилы человека синтезируют в основном ЛТС₄, а нейтрофилы-ЛТВ₄.

Метаболизм лейкотриенов

Метаболизм лейкотриенов не изучен так тщательно, как метаболизм простагландинов. Как описано выше, ЛТС₄ может легко превращаться в LTD₄, а затем в LTE₄ в той же клетке, где происходил его биосинтез, причем все три соединения биологически активны. Эти пептидно-липидные лейкотриены инактивируются превращением в 6-trans-ЛТВ₄, что наблюдается при образовании хлорноватистой кислоты в результате дыхательного взрыва в стимулированных лейкоцитах.

Лейкотриен В₄ также инактивируется в той же клетке, где он образуется. Уникальный, связанный с мембраной фермент цитохром Р₄₅₀ превращает ЛТВ₄ в 20-гидрокси-ЛТВ₄, который подвергается дальнейшему превраще-

нию разными растворимыми ферментами до 20-карбоксии-ЛТВ₄. Эта реакция легко протекает в полиморфно-ядерных лейкоцитах (ПМЯЛ) человека, а ПМЯЛ других видов и другие лейкоциты человека неспособны к метаболизму ЛТВ₄. Метаболиты ЛТВ₄ биологически менее активны, чем исходное соединение.

Образование других эйкозаноидов

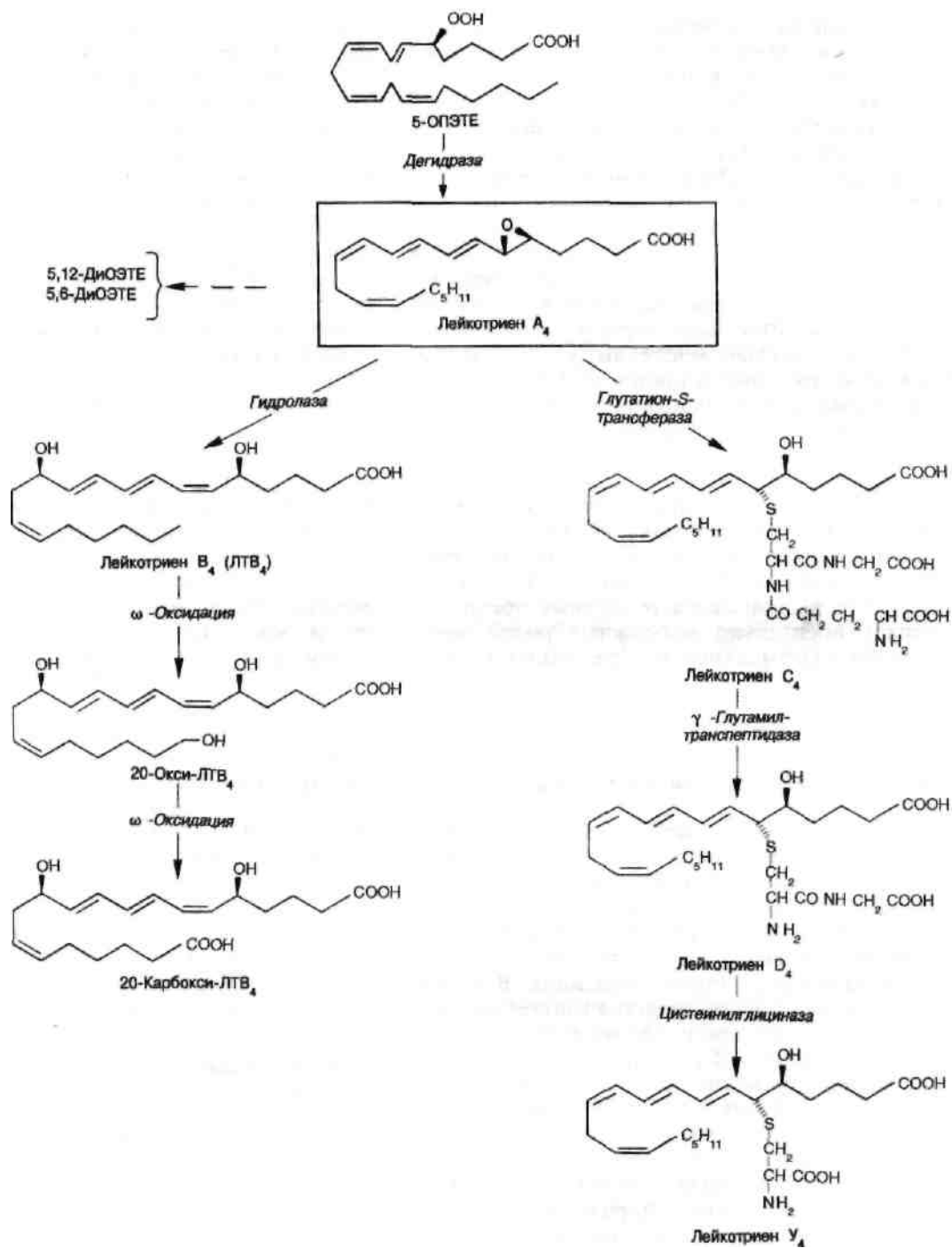
Описанные выше эйкозаноиды (т. е. простагландины, простаглицлин, тромбксаны, моногидроперокси- и гидроксикислоты, лейкотриены) в настоящее время считаются наиболее важными в биологическом отношении. Однако стоит отметить, что арахидоновая кислота может превращаться в другие метаболиты, патофизиологическая роль которых пока неизвестна. К ним относятся липоксины, содержащие в своей структуре конъюгированный тетраен, тригидроксиэйкозатетраеновые и эпокси-гидрокси-эйкозатетраеновые кислоты.

Биологическая активность эйкозаноидов

Выделение и очистка эйкозаноидов из биологических тканей позволили идентифицировать их структуру, что в свою очередь дало возможность синтезировать чистые соединения. Доступность «чистых стандартов» в значительной степени способствовала исследованиям роли различных эйкозаноидов в физиологических и патофизиологических процессах. Эйкозаноиды обладают сильными и разнообразными биологическими эффектами; многие из известных сейчас эйкозаноидов были первоначально обнаружены при проведении биологического тестирования.

Простагландины, например, были впервые идентифицированы по вызываемому ими сокращению миомерия, а позднее обнаружилось, что они стимулируют гладкие мышцы сосудов, кишечника и бронхов. Изучение анафилаксии в дыхательных путях позволило выделить вещество, вызывающее медленное и длительное сокращение гладких мышц. Это вещество известно теперь как МДВ-А; впоследствии оно было идентифицировано в виде смеси лейкотриенов (см. выше). На основании гладкомышечной активности предполагается, что эйкозаноиды выполняют важные функции в сердечно-сосудистой системе, дыхательных путях и репродуктивных органах.

Биологические возможности эйкозаноидов



не ограничены гладкими мышцами. Эйкозаноиды также являются мощными активаторами клеток крови, в частности тромбоцитов и лейкоцитов. Тромбоксан A_2 индуцирует агрегацию тромбоцитов, а простаглицлин предупреждает их агрегацию, вызванную различными стимулами. Лейкотриен B_4 и некоторые гидроксикислотные продукты арахидоновой кислоты обладают высокой хемотаксической активностью в отношении лейкоцитов. Как уже отмечалось, различные ткани синтезируют характерные профили эйкозаноидов; например, тромбоциты синтезируют в основном TOA_2 , а сосудистый эндотелий — простаглицлин. Поскольку ряд эйкозаноидов обладает противоположными формами биологической активности, профиль метаболизма арахидоновой кислоты в различных тканях имеет важное функциональное значение.

Кроме того, эйкозаноиды участвуют в таких системах, как передача внутриклеточных сигналов, цитопротекция, иммунная система, формирование факторов боли и лихорадки, ввиду чего выдвигаются различные предположения относительно возможных ролей эйкозаноидов в нормальных и пораженных тканях.

Роль эйкозаноидов в воспалении

Синтез эйкозаноидов при воспалении

Воспаление — это физиологическая реакция ткани на травму или раздражение. При воздействии на ткани механических, химических или иммунологических стимулов происходят синтез и высвобождение эйкозаноидов, поэтому воспалительная реакция всегда сопровождается выделением простаглицлинов. В воспаленных тканях обнаруживается множество различных эйкозаноидов, но доминирующим продуктом является $ПГЕ_2$. Наблюдается также присутствие тромбоксанов, простаглицлина и лейкотриенов. Синтез эйкозаноидов сопровождает ряд воспалительных заболеваний — от острого солнечного ожога до хронического ревматоидного артрита. Кроме того, в этот список входят ожоговые поражения, контактная экзема, псориаз, язвенный колит, увеит, остеоартриты и подагра.

При экспериментальном воспалении максимальный синтез эйкозаноидов наблюдается в острую фазу. Образование TOA_2 и $ЛТВ_4$ быстро прекращается, а синтез $ПГЕ_2$ (хотя он и сохраняется) ослабевает по мере прогресси-

рования воспалительного процесса. Тем не менее ткани, пораженные хроническим воспалением, продолжают генерировать эйкозаноиды. В тканях гранулемы через несколько дней после начала воспаления определяется высокое содержание эйкозаноидов, а синовиальные ткани через несколько дней после индукции иммунного артрита обнаруживают повышенную способность метаболизировать арахидоновую кислоту. Более того, образование эйкозаноидов хронически воспаленными тканями проявляется высоким уровнем $ПГЕ_2$ и $ЛТВ_4$, определяемым в синовиальной жидкости, аспирируемой из суставов больных ревматоидным артритом (см. главу 33) или подагрой.

В воспалительной реакции участвуют несколько типов клеток, в том числе клетки окружающих тканей и кровеносных сосудов, а также мигрирующие клетки крови. Клетки различных типов вносят разные эйкозаноиды. Хотя высокие концентрации TOB_2 определяются на ранних стадиях экспериментального воспаления, тромбоциты (основной источник тромбоксанов), вероятно, не являются источником эйкозаноидов в воспаленных тканях. У животных при сниженном содержании тромбоцитов концентрации TOB_2 , $ПГЕ_2$ и 6-кето- $ПГF_{1a}$ в воспалительных экссудатах не отличаются от таковых у контрольных животных. У животных с невысоким уровнем $ПМЯЛ$ концентрации TOB_2 и $ЛТВ_4$ снижены, причем их уменьшение идет параллельно сокращению числа $ПМЯЛ$, накапливающихся в экссудате. Однако образование $ПГЕ_2$ и простаглицлина остается практически неизменным при отсутствии $ПМЯЛ$. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что при остром воспалении $ПМЯЛ$ служат главным источником TOB_2 и $ЛТВ_4$, а $ПГЕ_2$ и простаглицлин образуются в окружающих тканях и кровеносных сосудах.

Воспалительные свойства эйкозаноидов

Некоторые эйкозаноиды, особенно $ПГЕ_2$, вносят свой вклад в симптомы воспаления. Простаглицлин E_2 и простаглицлин расслабляют гладкие мышцы сосудов и сильно расширяют прекапиллярные артериолы, в результате чего наблюдается характерная краснота (или эритема), сопровождающая острое воспаление. Кроме того, возрастает приток крови к воспаленным тканям, что в свою очередь увеличивает потерю плазмы, которая обусловлена действием веществ, повышающих проницаемость сосудов (гистамин, брадикинин). Совместные

эффекты увеличенного кровотока и повышенной проницаемости сосудов приводят к опухали или отеку (см. главу 7). Тромбоксан A_2 является мощным вазоконстриктором, и его образование при остром воспалении, вероятно, необходимо для предупреждения кровотечений. Продукты липоксигеназы в основном слабо влияют на сосудистый тонус, но LTB_4 , LTC_4 и LTD_4 вызывают образование волдырей и расслабление сосудов кожи человека посредством неизвестных механизмов.

Лейкотриен B_4 - один из наиболее мощных среди известных сегодня факторов хемотаксиса лейкоцитов. Его активность обнаруживается во многих системах *in vitro*. Показано также, что LTB_4 обуславливает маргинацию лейкоцитов в микроциркуляции и их накопление во внесосудистых тканях. На этих наблюдениях основывается теория о локальном образовании LTB_4 как о важном механизме местного контроля рекрутирования воспалительных лейкоцитов в поврежденные ткани. Наряду с другими факторами хемотаксиса (например, Sb_a компонента) LTB_4 вызывает высвобождение лизосомных ферментов, что вносит дегенеративный компонент во многие воспалительные заболевания. В клеточной реакции участвует и другой продукт липоксигеназы-12-ГОТЕ. Хемотаксическая активность 12-ГОТЕ слабее, чем у LTB_4 , однако высокие концентрации 12-ГОЭТЕ могут определяться в коже больных псориазом, что, вероятно, связано с большим количеством ПМЯЛ, инфильтрирующих дерму при этом воспалительном заболевании.

Эйкозаноиды вносят определенный вклад в такие симптомы воспаления, как боль и лихорадка. Простагландин E_2 и простаглицлин усиливают боль, вызванную брадикинином и гистамином, сенсбилизируя афферентные С-волокна (т. е. индуцируют состояние гипералгезии). Такая повышенная чувствительность обуславливает восприятие нормальных (не болевых) стимулов как болезненных; например, кожа при солнечном ожоге легко травмируется (натирается) даже одеждой. Простагландин E_2 представляет собой сильный пирогенный фактор; его высокие концентрации определяются в спинномозговой жидкости больных с бактериальной или вирусной инфекцией, вирусным энцефалитом или пирогенным менингитом. Пирогенная активность интерлейкина-1 (эндогенный пироген) опосредуется образованием PGE_2 (см. главы 15 и 19).

Таким образом, эйкозаноиды (например,

PGE_2 , простаглицлин, LTB_4 и 12-ГОЭТЕ) продуцируются при воспалении и обладают высокой воспалительной активностью. Влияние противовоспалительных препаратов на метаболизм арахидоновой кислоты подтверждает роль эйкозаноидов как медиаторов воспаления. Ингибиторы синтеза простаглицлинов, такие как препараты, подобные ацетилсалициловой кислоте, обладают противовоспалительным, анальгезирующим и жаропонижающим действием. Аналогично этому препараты, снижающие липоксигеназную или циклооксигеназную активность, подавляют активацию лейкоцитов (см. главы 23 и 24).

Эйкозаноиды при анафилаксии дыхательных путей

Выделение МДВ-А при реакциях гиперчувствительности немедленного типа изучалось в течение многих лет, поскольку предполагалось, что именно это вещество опосредует бронхоспазм при бронхиальной астме у человека. Как уже отмечалось выше, в настоящее время установлено, что смесь LTC_4 , LTD_4 и LTE_4 обладает биологической активностью МДВ-А. Эти пептидно-липидные лейкотриены в качестве бронхоконстрикторов и веществ, вызывающих сокращение гладких мышц дыхательных путей, на 2-3 порядка сильнее гистамина. Лейкотриен E_4 слабее LTC_4 или LTD_4 , но он действует более длительное время. Помимо бронхоспастического эффекта, лейкотриены, видимо, обладают стимулирующим влиянием на секрецию слизи и, следовательно, усугубляют нарушения проходимости дыхательных путей.

Лейкотриены сокращают *in vitro* трахеальные и бронхиальные гладкие мышцы, однако эксперименты *in vivo* свидетельствуют об избирательности их действия в отношении нижних дыхательных путей. LTC_4 и LTD_4 вызывают преимущественно уменьшение податливости дыхательных путей и относительно менее эффективны в снижении их специфической проводимости. При введении LTC_4 и LTD_4 добровольцам отмечаются кашель, свистящее дыхание, стеснение в груди и уменьшение скорости потока воздуха при максимальном выдохе. Обнаружение лейкотриенов в мокроте больных астмой и в носовых смывах аллергиков после введения им антигена дает дополнительные аргументы в пользу представления о лейкотриенах как о важных медиаторах анафилактических респираторных заболеваний.

Селективные антагонисты лейкотриенов уменьшают бронхоспазм *in vivo*, однако такого рода препаратов, пригодных для проведения тестирования у людей, пока нет. Конечно, кортикостероиды, которые ослабляют оба пути метаболизма арахидоновой кислоты (см. главу 24), очень эффективны при лечении астмы. Но это вряд ли обусловлено их влиянием на синтез простагландинов или тромбоксанов, поскольку селективные ингибиторы циклооксигеназы не оказывают благоприятного действия и могут даже (в некоторых случаях) обострить бронхиальную анафилаксию. И действительно, по имеющимся сегодня данным, продукты обмена циклооксигеназы модулируют бронхоспазм, подавляя синтез лейкотриенов.

Резюме

Окислительные ферменты, катализирующие превращение арахидоновой кислоты в простагландины, тромбоксаны и лейкотриены, широко распространены в тканях млекопитающих. Эти ферменты активируются при стимуляции клеточных мембран или при их повреждении. Образующиеся при этом эйкозаноиды обладают высокой биологической активно-

стью. Эйкозаноиды действуют как местные гормоны, участвующие в физиологических и патофизиологических процессах. Эйкозаноиды часто действуют синергично с другими медиаторами, усиливая и расширяя реакцию. Терапевтические и токсические эффекты многих противовоспалительных препаратов могут частично или полностью объясняться их вмешательством в синтез эйкозаноидов.

11 Факторы хемотаксиса нейтрофилов и эозинофилов при аллергии и астме

А. Б. Кей (А. В. Kay)

Эозинофилы и нейтрофилы — это подвижные клетки, которые «распластываются» по стеклу и отвечают хемотаксисом (миграция по градиенту) и(или) хемокинезом (увеличение скорости случайного движения). Обнаружено большое количество факторов хемотаксиса эозинофилов и нейтрофилов, однако биологическое значение многих из них остается неясным. Широко распространено мнение, что продукты тучных клеток играют важную роль в привлечении нейтрофилов и эозинофилов к месту возникновения аллергических реакций в тканях. Результаты последних исследований показали необходимость изменения этих взглядов, поскольку другие клетки, например эозинофилы, макрофаги и тромбоциты, также несут функциональные IgE(Fc)-рецепторы.

Теоретически существует несколько механизмов, объясняющих накопление клеток в местах воспаления тканей. Они включают повышенный хемокинез, контактную задержку клеток в очаге воспаления и уменьшенный выход клеток из очага. В этом плане наиболее привлекательным механизмом является миграция клеток из сосудов под действием хемотаксических медиаторов. Этот процесс включает в себя первоначальное прикрепление клеток к сосудистому эндотелию (большинство медиаторов хемотаксиса облегчает адгезию гранулоцитов) с последующим диапедезом и направленной миграцией по хемотаксическому градиенту. Воспалительные медиаторы, принимающие участие в данном процессе при аллергии и астме, точно не установлены.

Факторы хемотаксиса нейтрофилов при аллергии и астме

Идентификация

Индукцированная аллергеном нейтрофильная хемотаксическая активность (НХА) идентифицируется *in vitro* (т. е. по специфически сенсibilизированным эффекторным клеткам) или *in vivo* (в жидких средах организма у аллергиков после аллергенной провокации).

В 1977 г. Atkins и соавт. описали высокомолекулярную термостабильную НХА, выделяющуюся в циркуляцию у больных бронхиальной астмой после ингаляции специфического антигена. Те же исследователи показали, что предварительное введение динатриевого хромогликата (ДНХГ, хромолин) подавляет выделение НХА, что свидетельствует о связи данного феномена с тучными клетками. Наблюдение изменений концентраций НХА при высвобождении гистамина из иммунологически стимулируемых сенсibilизированных фрагментов легких подтверждает эту точку зрения.

Например, O'Driscoll и соавт., используя легочные фрагменты, стимулированные кроличьим анти-IgE, показали, что у человека высокомолекулярная НХА имеет легочное происхождение. НХА легких человека представляется гетерогенной, хотя один из пиков активности имеет практически идентичные характеристики (при гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, изоэлектрофокусировании) с НХА, выделенной из крови больных астмой.

Таким образом, существуют доказательства выделения аналогичных высокомолекулярных соединений при иммунологической стимуляции легочных фрагментов *in vitro* и ингаляционной провокации при бронхиальной астме *in vivo*. Интересными представляются наблюдения Schenkel и соавт., которые описали высокомолекулярную НХА из легочных фрагментов активно сенсibilизированных морских свинок после введения им разрешающей дозы специфического антигена. НХА, по видимому, представляет основную часть хемотаксической активности нейтрофилов (в отличие от эозинофилов) в этих легочных супернатантах. Доказательства тучноклеточного происхождения НХА (как единственного) остаются неокончательными, хотя есть основания предположить, что вещество, выделяющееся совместно с гистамином и блокирующееся ДНХГ, имеет какое-то отношение к тучным клеткам.

Неспецифическое выделение НХА

Особый интерес представляют наблюдения, касающиеся возникновения НХА при неиммунологической стимуляции. Wasserman и соавт. описали ВМ-НХФ, выделяющийся в венозную кровь (вместе с гистамином) после холодовой иммерсии больных с холодовой крапивницей. Аналогичные НХА идентифицированы при холинергической, солнечной и тепловой крапивницах после предъявления соответствующих стимулов. Lee и соавт. показали, что НХА, определяемая в сыворотке при астме, вызванной физической нагрузкой (НХА-фн), по своим физико-химическим характеристикам идентична НХА у больных астмой, получивших разрешающую дозу антигена через бронхи (НХА-аг). Так, НХА-фн и НХА-аг имеют молекулярную массу 600 000 дальтон, элюируются единичным пиком активности между 0,15 и 0,30 М NaCl при обменной анионной хроматографии на DEAE Sephacell, а их изоэлектрические точки, определяемые при электрофокусировании, находятся в промежутке между 6 и 6,5. Интенсивность НХА-фн и НХА-аг после инкубации с трипсином и химотрипсином существенно снижается (как в дозовой, так и во временной зависимости). Эти характеристики практически аналогичны наблюдаемым при НХФ холодовой крапивницы (макромолекула с нейтральной изоэлектрической точкой).

Полученные данные четко указывают на близкое родство или полную аналогию между НХФ, образуемыми при астме и крапивнице после соответствующей стимуляции, и НХФ, выделяемыми фрагментами легких морских свинок и человека. Однако до установления химической структуры этот вопрос не может быть решен окончательно. До настоящего момента любое определение интенсивности НХА обязательно включает биологическое тестирование (метод Bouden, при котором нормальные нейтрофилы служат индикаторными клетками).

Стимулы, вызывающие возникновение НХА при астме, индуцированной физической нагрузкой

Данные о том, что НХА возникает при астме, вызванной физической нагрузкой (АВФН), и отсутствует при бронхоспазме, обусловленном гипервентиляцией, свидетельствуют о существовании различий между АВФН и изокапниче-

ской гипервентиляцией (ИКГВ)¹. Например, ИКГВ холодным воздухом не сопровождается фазой бронходилатации (наблюдаемой при физических упражнениях у больных симптоматической астмой), латентной фазой, рефрактерным периодом и базофилией крови. Более того, антихолинергические препараты, подавляющие астму, индуцированную физической нагрузкой, у определенной части больных не влияют на сопротивление воздушного потока, которое возникает при ИКГВ охлажденным воздухом. Эти наблюдения показывают, что хотя потеря тепла и(или) воды в дыхательных путях может быть иницирующим фактором (стимулом), возникновению АВФН способствуют и другие факторы. Вряд ли базофилы служат источником НХА при стимуляции, поскольку базофилия вследствие физической нагрузки наблюдается и у нормальных лиц, однако в этом случае она не сопровождается увеличением НХА в сыворотке. Кроме того, у астматиков без АВФН, которые испытывали такую же физическую нагрузку, как и больные с ИКГВ, наблюдалась сравнимая базофилия, но с небольшим повышением циркулирующей НХА. Наконец, неспособность ДНХГ подавлять выброс медиаторов из базофилов *in vitro* свидетельствует против предположения об этих клетках как об источнике НХА.

Участие НХА в реакциях поздней фазы

Нами установлено, что НХА выделяется при поздних астматических реакциях после ингаляции антигена. Позднее повышение НХА предшествует позднему падению ОФВ примерно на 3 ч и бывает более устойчивым, чем при немедленной астматической реакции (через 10-15 мин после антигенной нагрузки). Физико-химические характеристики НХА поздней фазы аналогичны таковым ранней фазы (одинаковая молекулярная масса, идентичные хроматографические параметры на DEAE-Sephacell и изоэлектрические точки). Эти наблюдения свидетельствуют в пользу предположения об участии тучных клеток как в поздней, так и в ранней фазах реакции. Точный механизм активации тучных клеток при поздних реакциях неясен. Возможно, он связан со вторым спонтанным выбросом медиаторов из уже активированных тучных клеток, что показано на

¹ Гипервентиляция с нормальным уровнем CO₂ в альвеолах и артериальной крови.

крысиных перитонеальных тучных клетках. Альтернативно предполагается, что инфильтрирующие воспалительные клетки (возможно, нейтрофилы) вызывают второе выделение НХА за счет высвобождения содержимого ли-зосом, что было показано ранее в экспериментах *in vitro*. Вряд ли второй выброс НХА иммунологически специфичен (т. е. обусловлен медленной абсорбцией антигена), поскольку поздние астматические реакции при физической нагрузке также сопровождаются поздним подъемом НХА. Величина и динамика уменьшения ОФВ1 и возрастания НХА в ранние и поздние фазы астмы, вызванной физической нагрузкой, аналогичны ранее описанным при антигенной ингаляторной нагрузке.

НХА при астматическом статусе

Содержание НХА в сыворотке больных при астматическом статусе (*status asthmaticus*) [Buchanan et al., 1987] увеличивается по сравнению с контрольной группой (слабая астма, стабильная, необратимая обструкция воздушного потока, неинфекционные легочные заболевания, бессимптомные состояния). Серийные изменения НХА также были проведены у 12 больных с острой астмой при их поступлении в клинику, через 3 дня после начала лечения и при выписке (примерно на 7-й день). Выявлено весьма достоверное ($p < 0,001$) снижение НХА в сыворотке на 7-й день по сравнению с нулевым днем, что коррелирует с улучшением функции легких (PEFR). При гель-фильтрации методом быстрой белковой жидкостной хроматографии (ББЖК) с использованием Superose 6 *prep*, *grade* обнаружено, что НХА при астматическом статусе достаточно гетерогенна и имеет по крайней мере четыре пика активности, которые обусловлены белковыми молекулами с массой 800, 600, 150 и < 20 kD. Менее выраженные (800 и 150 kD) пики отмечены и в контрольной группе. Активность 600 и 20 kD характерна только для больных с астматическим статусом. Хроматофокусирование пика 600 kD при ББЖК с использованием колонки *mono-p* и градиента pH от 8,3 до 5,0 у больных с астматическим статусом выявило значительную активность во фракциях, элюирующихся при pH между 6,0 и 7,0, которая не обнаруживалась в нормальной контрольной группе. Второй пик, связанный с $pI > 7,0$, наблюдался при острой и легкой формах астмы и у здоровых лиц.

Данные наблюдения свидетельствуют о

следующем: а) высокомолекулярная нейтрофильная хемотаксическая активность, связанная с астмой (ВММ-НХА), определяется в сыворотке при острой форме заболевания; б) активность значительно снижается при лечении; в) ВММ-НХА при астматическом статусе (и в некоторых контрольных группах) является гетерогенной; г) пик хемотаксической активности связан с молекулярной массой 600 kD и изоэлектрической точкой pI между 6,0 и 7,0. Следовательно, по этим параметрам активность вполне сравнима с наблюдаемой при аллергических и вызванных физической нагрузкой ранних и поздних астматических реакциях.

Роль НХА

Патофизиологическая роль НХА при тканевых аллергических реакциях в отличие от ее значения как маркера активации тучных клеток в настоящее время только исследуется. Ввиду значительных трудностей в получении достаточных количеств НХА для детальных биологических исследований сравнение НХА с другими известными медиаторами гиперсенситивности по специфической активности не представляется возможным. Тем не менее нами показано, что НХА, как и другие хемоаттрактанты, обладает разнообразными эффектами в отношении функции нейтрофильных лейкоцитов, включая увеличение случайного и направленного движения, увеличение количества СЗБ-рецепторов на нейтрофильных лейкоцитах, стимуляцию выделения лизоцима и (в меньшей степени) миелопероксидазы, а также ускорение опосредованной нейтрофилами комплементзависимой гибели личинок гельминтов. Таким образом, НХА имеет характеристики, аналогичные таковым другим хемоаттрактантов, с потенциальной значимостью основного участника воспалительной реакции.

Выводы

НХА-термостабильная макромолекула, которая, по-видимому, является полезным маркером иммунной или неспецифической активации тучных клеток. Происхождение НХА из тучных клеток или из каких-либо вторичных клеток, активированных в результате дегрануляции тучных клеток, пока не установлено. Данный фактор (или факторы) был идентифицирован при физических крапивницах, а также при ранних и поздних фазах астмы, инду-

цированной антигеном или нагрузками. НХА выделяется при некоторых типах пищевой астмы. По биологической активности НХА подобна другим хемотаксическим факторам, но сравнительный потенциал и специфическая активность этих факторов еще не определены. Вероятно, данный медиатор особенно интересует клиницистов, желающих точно выяснить роль медиаторных клеток и их продуктов при различных заболеваниях, сопровождающихся аллергией.

Эозинофильные хемотаксические факторы при аллергии и астме

Эозинофильный хемотаксический фактор анафилаксии (ЭХФ-А)

Описано немало факторов и медиаторов с эозинофилоаксической активностью. Одним из факторов, привлекающих значительное внимание, является эозинофильный хемотаксический фактор анафилаксии. Супернатанты культур небольших фрагментов легких, стимулированных аллергеном или анти-IgE, содержат эозинофильную хемотаксическую активность. Активность имеет место в низкомолекулярной области (360-1000D) и названа эозинофильным хемотаксическим фактором анафилаксии, чтобы отличить ее от других эозинофильных хемотаксических факторов, например производных системы комплемента (ЭХФ-К).

Характеристики генерирования ЭХФ-А, такие как IgE-зависимая стимуляция, временные параметры и биохимические условия выделения, аналогичны таковым гистамина. Предполагается, что ЭХФ-А имеет тучноклеточное происхождение или по крайней мере является медиатором, связанным с этими клетками. Подтверждением служит продемонстрированная у крыс локализация ЭХФ-А в тучных клетках, вероятно, в ассоциации с гранулами. Из размельченного человеческого легкого с помощью экстракции бутанол/ледяная уксусная кислота выделяется большое количество растворимой хемотаксической активности, которая разделяется на три пика при хроматографии на Sephadex G-25 (Mm>10000, 2000-4000 и 300-1000D). Последний пик имеет те же физико-химические характеристики, что и ЭХФ-А. При последующей очистке были получены два кислых тетрапептида, идентифицированных как ЭХФ-А (вал-гли-сер-глю и ала-гли-сер-глю). В более поздних исследова-

ниях, включающих экстракцию 1 M NaCl и очистку при помощи жидкостной хроматографии высокого давления, был определен ряд других пептидов, что свидетельствует о принадлежности ЭХФ-А к семейству родственных олигопептидов, особенно если учесть слабую и непостоянную активность двух полностью охарактеризованных пептидов [Goetzl, Austen, 1980]. Впоследствии в плазме больных астмой была выявлена низкомолекулярная хемотаксическая активность, сопровождающая позднюю реакцию на аллергеновую нагрузку, хотя данная связь охарактеризована недостаточно.

Гистамин как эозинофилоаксический фактор

Эозинофилоаксическая активность гистамина остается источником некоторых противоречий. Первоначальные исследования показали отсутствие такой активности. В работе Clark и соавт. (1976) была определена активность гистамина в диапазоне доз 10^{-7} - 10^{-8} M. Turnbull и Kay (1976) также обнаружили некоторую активность гистамина, но не очень значительную и только при высоких концентрациях (10^{-5} M). Помещение различных веществ на поврежденную кожу вызывает слабый по сравнению со специфическим аллергеном эозинофильный ответ. Наиболее активным из химически охарактеризованных медиаторов локомоции эозинофилов является ЛТВ₄.

Фактор активации тромбоцитов как эозинофилоаксический фактор

В настоящее время ФАТ признан весьма эффективным и постоянным промотором эозинофильной локомоции в диапазоне концентраций 10^{-8} - 10^{-5} M (оптимально 10^{-6} M); ли-зо-ФАТ в тех же концентрациях обладает минимальным эффектом [Wardlaw et al., 1986]. По влиянию на локомоцию эозинофилов ФАТ значительно активнее ЛТВ₄, гистамина и двух ЭХФ-А тетрапептидов. Аналогичные результаты были получены как на смешанных, так и на гомогенных популяциях эозинофилов нормальной и легкой плотности, которые разделялись по градиенту метризамида и использовались как индикаторные клетки. ФАТ обладает хемотаксической и хемокинетической активностью и подавляет локомоцию эозинофилов при концентрации выше 10^{-5} M.

Нами проведено также сравнение ФАТ с рядом других предполагаемых факторов хемотаксиса эозинофилов, включая сыворотку, ак-

тивированную зимозаном, C5a, дез-арг C5a и ФМЛФ [Wardlaw, Kay, 1987]. Из них только C5a и дез-арг C5a обладают определенной хемотаксической активностью. Оптимальной концентрацией C5a является 10^{-8} М, а дез-арг C5a- 10^{-7} М. Активность пептидов комплемента составляет примерно 50% активности, выявляемой при использовании оптимальной концентрации ФАТ. Специфическим антагонистом ФАТ является соединение BN 52021, получаемое из личинок *Ginkgo biloba*. Это вещество подавляет индуцированный ФАТ хемотаксис человеческих эозинофилов и нейтрофилов. Подавление хемотаксиса эозинофилов при оптимальной концентрации ФАТ бывает значительно более сильным по сравнению с подавлением локомоции нейтрофилов. IC_{50} для эозинофилов составляет $7,0 [\pm 2,2] \times 10^{-6}$ М, а для нейтрофилов- $2,3 [+ 0,2] \times 10^{-5}$ М. Преинкубация клеток в течение 6 ч с хромогликатом натрия, недохромиллом натрия, салбутамолом и дексаметазоном не вызывает эффекта в широком диапазоне концентраций (10^{-3} - 10^{-9} М). Это свидетельствует о том, что эффект преднизолона, подавляющий миграцию эозинофилов в дыхательных путях после предъявления антигена, не связан с его прямым действием на эозинофилы. Ин-гибирование BN 52021 специфично по отношению к ФАТ и не проявляется при хемотаксисе, вызванном ЛТВ₄, ФМЛФ или очищенным нейтрофильным хемотаксическим фактором из мононуклеарных клеток человека. BN 52021 также подавляет специфическое связывание [³H]-ФАТ с эозинофилами и нейтрофилами (в зависимости от концентрации) при IC_{50} $1,5[\pm 0,3] \times 10^{-6}$ М и $9,1[\pm 2,5] \times 10^{-7}$ М соответственно. BN 52021, вероятно, может быть противовоспалительным препаратом при состояниях, сопровождающихся ФАТ-индуцированной инфильтрацией нейтрофилами и эозинофилами.

Внутрикожная инъекция до 800 пмоль ФАТ неатопическим здоровым добровольцам вызывает образование волдыря и покраснение, начинающееся через 5 мин и сохраняющееся около 30 мин. У 50% испытуемых наблюдается отсроченное начало эритематозной реакции. Гистологическое исследование места инъекции через 4 ч выявляет интенсивный воспалительный инфильтрат, преимущественно нейтрофильный, с некоторым количеством эозинофилов и мононуклеарных клеток. Напротив, инъекция ФАТ атопическим больным приводит к миграции большого количества эозинофилов

в полость волдыря, как и при предъявлении антигена [Henocq, Vargaftig, 1986].

Мы исследовали влияние ингаляции ФАТ на клеточный состав бронхоальвеолярного лаважа у атопических и неатопических некурящих лиц и обнаружили увеличение процента нейтрофилов в бронхоальвеолярном лаваже в сравнении со смешанной группой, где проводилась ингаляция лизо-ФАТ. У этих испытуемых не выявлено эозинофилии в периферической крови, хотя у одного из них была умеренная эпизодическая астма, а у другого - сезонный аллергический ринит. *In vitro* ФАТ не обладает преимущественной активностью по отношению к эозинофилам, поэтому его участие в привлечении эозинофилов в дыхательные пути при астме следует объяснить существованием другого фактора, делающего эозинофилы более чувствительными по сравнению с нейтрофилами (т. е. синергизм со специфическим активирующим фактором эозинофилов). Маловероятно, что ФАТ или ЛТВ₄ способствует активности ЭХФ-А, так как тучные клетки не являются главным источником этих медиаторов. Более того, мы не обнаружили ФАТ и хемотаксические концентрации ЛТВ₄ в супернатантах препаратов размельченных легких несмотря на наличие в них эозинофильной хемотаксической активности и значительное выделение гистамина.

Эозинофильная хемотаксическая активность и астма

Клеточный источник эозинофильной хемотаксической активности, приводящей к инфильтрации эозинофилами дыхательных путей после антигенной нагрузки или при постоянной астме, пока неизвестен. Введение аллергена в кожу, которое приводит к поздней реакции, характеризуется притоком нейтрофилов, вскоре сменяющихся эозинофилами, а затем (через 24 ч) мононуклеарными клетками. При ингаляции антигена наблюдается аналогичная картина (по крайней мере, в отношении эозинофилов) в верхних и нижних дыхательных путях. Традиционно этот процесс связывался с медиаторами тучных клеток, поскольку он опосредовался IgE, а соединение 48/80 провоцировало сходную, но значительно более слабую реакцию. В настоящее время эта точка зрения подвергается сомнению ввиду того, что некоторые другие клетки также несут функциональные IgE-рецепторы (тромбоциты, моноциты, лимфоциты и эозинофилы), а такие мощные

цированной антигеном или нагрузками. НХА выделяется при некоторых типах пищевой астмы. По биологической активности НХА подобна другим хемотаксическим факторам, но сравнительный потенциал и специфическая активность этих факторов еще не определены. Вероятно, данный медиатор особенно заинтересует клиницистов, желающих точно выяснить роль медиаторных клеток и их продуктов при различных заболеваниях, сопровождающихся аллергией.

Эозинофильные хемотаксические факторы при аллергии и астме

Эозинофильный хемотаксический фактор анафилаксии (ЭХФ-А)

Описано немало факторов и медиаторов с эозинофилотаксической активностью. Одним из факторов, привлекающих значительное внимание, является эозинофильный хемотаксический фактор анафилаксии. Супернатанты культур небольших фрагментов легких, стимулированных аллергеном или анти-IgE, содержат эозинофильную хемотаксическую активность. Активность имеет место в низкомолекулярной области (360-1000D) и названа эозинофильным хемотаксическим фактором анафилаксии, чтобы отличить ее от других эозинофильных хемотаксических факторов, например производных системы комплемента (ЭХФ-К).

Характеристики генерирования ЭХФ-А, такие как IgE-зависимая стимуляция, временные параметры и биохимические условия выделения, аналогичны таковым гистамина. Предполагается, что ЭХФ-А имеет тучноклеточное происхождение или по крайней мере является медиатором, связанным с этими клетками. Подтверждением служит продемонстрированная у крыс локализация ЭХФ-А в тучных клетках, вероятно, в ассоциации с гранулами. Из размельченного человеческого легкого с помощью экстракции бутанол/ледяная уксусная кислота выделяется большое количество растворимой хемотаксической активности, которая разделяется на три пика при хроматографии на Sephadex G-25 (Mm > 10000, 2000-4000 и 300-1000D). Последний пик имеет те же физико-химические характеристики, что и ЭХФ-А. При последующей очистке были получены два кислых тетрапептида, идентифицированных как ЭХФ-А (вал-гли-сер-глю и ала-гли-сер-глю). В более поздних исследова-

ниях, включающих экстракцию 1 M NaCl и очистку при помощи жидкостной хроматографии высокого давления, был определен ряд других пептидов, что свидетельствует о принадлежности ЭХФ-А к семейству родственных олигопептидов, особенно если учесть слабую и непостоянную активность двух полностью охарактеризованных пептидов [Goetzl, Austen, 1980]. Впоследствии в плазме больных астмой была выявлена низкомолекулярная хемотаксическая активность, сопровождающая позднюю реакцию на аллергеновую нагрузку, хотя данная связь охарактеризована недостаточно.

Гистамин как эозинофилотаксический фактор

Эозинофилотаксическая активность гистамина остается источником некоторых противоречий. Первоначальные исследования показали отсутствие такой активности. В работе Clark и соавт. (1976) была определена активность гистамина в диапазоне доз 10^{-7} - 10^{-8} M. Turnbull и Kay (1976) также обнаружили некоторую активность гистамина, но не очень значительную и только при высоких концентрациях (10^{-5} M). Помещение различных веществ на поврежденную кожу вызывает слабый по сравнению со специфическим аллергеном эозинофильный ответ. Наиболее активным из химически охарактеризованных медиаторов локомоции эозинофилов является ЛТВ₄.

Фактор активации тромбоцитов как эозинофилотаксический фактор

В настоящее время ФАТ признан весьма эффективным и постоянным промотором эозинофильной локомоции в диапазоне концентраций 10^{-8} - 10^{-5} M (оптимально 10^{-6} M); ли-зо-ФАТ в тех же концентрациях обладает минимальным эффектом [Wardlaw et al., 1986]. По влиянию на локомоцию эозинофилов ФАТ значительно активнее ЛТВ₄, гистамина и двух ЭХФ-А тетрапептидов. Аналогичные результаты были получены как на смешанных, так и на гомогенных популяциях эозинофилов нормальной и легкой плотности, которые разделялись по градиенту метризамиды и использовались как индикаторные клетки. ФАТ обладает хемотаксической и хемокинетической активностью и подавляет локомоцию эозинофилов при концентрации выше 10^{-5} M.

Нами проведено также сравнение ФАТ с рядом других предполагаемых факторов хемотаксиса эозинофилов, включая сыворотку, ак-

тивированную зимозаном, C5a, дез-арг C5a и ФМЛФ [Wardlaw, Kay, 1987]. Из них только C5a и дез-арг C5a обладают определенной хемотаксической активностью. Оптимальной концентрацией C5a является 10^{-8} М, а дез-арг C5a- 10^{-7} М. Активность пептидов комплемента составляет примерно 50% активности, выявляемой при использовании оптимальной концентрации ФАТ. Специфическим антагонистом ФАТ является соединение BN 52021, получаемое из личинок *Ginkgo biloba*. Это вещество подавляет индуцированный ФАТ хемотаксис человеческих эозинофилов и нейтрофилов. Подавление хемотаксиса эозинофилов при оптимальной концентрации ФАТ бывает значительно более сильным по сравнению с подавлением локомоции нейтрофилов. IC_{50} для эозинофилов составляет $7,0 [\pm 2,2] \times 10^{-6}$ М, а для нейтрофилов- $2,3 [+ 0,2] \times 10^{-5}$ М. Преинкубация клеток в течение 6 ч с хромогликатом натрия, недохромилом натрия, салбутамолом и дексаметазоном не вызывает эффекта в широком диапазоне концентраций (10^{-3} - 10^{-9} М). Это свидетельствует о том, что эффект преднизолона, подавляющий миграцию эозинофилов в дыхательных путях после предъявления антигена, не связан с его прямым действием на эозинофилы. Ингибирование BN 52021 специфично по отношению к ФАТ и не проявляется при хемотаксисе, вызванном ЛТВ₄, ФМЛФ или очищенным нейтрофильным хемотаксическим фактором из мононуклеарных клеток человека. BN 52021 также подавляет специфическое связывание [³H]-ФАТ с эозинофилами и нейтрофилами (в зависимости от концентрации) при IC_{50} $1,5[\pm 0,3] \times 10^{-6}$ М и $9,1[\pm 2,5] \times 10^{-7}$ М соответственно. BN 52021, вероятно, может быть противовоспалительным препаратом при состояниях, сопровождающихся ФАТ-индуцированной инфильтрацией нейтрофилами и эозинофилами. Внутривенная инъекция до 800 пмоль ФАТ неатопическим здоровым добровольцам вызывает образование волдыря и покраснение, начинающееся через 5 мин и сохраняющееся около 30 мин. У 50% испытуемых наблюдается отсроченное начало эритематозной реакции. Гистологическое исследование места инъекции через 4 ч выявляет интенсивный воспалительный инфильтрат, преимущественно нейтрофильный, с некоторым количеством эозинофилов и мононуклеарных клеток. Напротив, инъекция ФАТ атопическим больным приводит к миграции большого количества эозинофилов

в полость волдыря, как и при предъявлении антигена [Henocq, Vargaftig, 1986].

Мы исследовали влияние ингаляции ФАТ на клеточный состав бронхоальвеолярного лаважа у атопических и неатопических некурящих лиц и обнаружили увеличение процента нейтрофилов в бронхоальвеолярном лаваже в сравнении со смешанной группой, где проводилась ингаляция лизо-ФАТ. У этих испытуемых не выявлено эозинофилии в периферической крови, хотя у одного из них была умеренная эпизодическая астма, а у другого - сезонный аллергический ринит. *In vitro* ФАТ не обладает преимущественной активностью по отношению к эозинофилам, поэтому его участие в привлечении эозинофилов в дыхательные пути при астме следует объяснить существованием другого фактора, делающего эозинофилы более чувствительными по сравнению с нейтрофилами (т. е. синергизм со специфическим активирующим фактором эозинофилов). Маловероятно, что ФАТ или ЛТВ₄ способствует активности ЭХФ-А, так как тучные клетки не являются главным источником этих медиаторов. Более того, мы не обнаружили ФАТ и хемотаксические концентрации ЛТВ₄ в супернатантах препаратов размельченных легких несмотря на наличие в них эозинофильной хемотаксической активности и значительное выделение гистамина.

Эозинофильная хемотаксическая активность и астма

Клеточный источник эозинофильной хемотаксической активности, приводящей к инфильтрации эозинофилами дыхательных путей после антигенной нагрузки или при постоянной астме, пока неизвестен. Введение аллергена в кожу, которое приводит к поздней реакции, характеризуется притоком нейтрофилов, вскоре сменяющихся эозинофилами, а затем (через 24 ч) мононуклеарными клетками. При ингаляции антигена наблюдается аналогичная картина (по крайней мере, в отношении эозинофилов) в верхних и нижних дыхательных путях. Традиционно этот процесс связывался с медиаторами тучных клеток, поскольку он опосредовался IgE, а соединение 48/80 провоцировало сходную, но значительно более слабую реакцию. В настоящее время эта точка зрения подвергается сомнению ввиду того, что некоторые другие клетки также несут функциональные IgE-рецепторы (тромбоциты, моноциты, лимфоциты и эозинофилы), а такие мощные

медиаторы, как ФАТ и ЛТВ₄, изначально имеют нетучноклеточное происхождение. Кроме того, кортикостероиды, предупреждающие позднюю реакцию, не отменяют дегрануляции легочных тучных клеток *in vitro*, а В₂-агонисты (сальбутамол), которые частично предупреждают дегрануляцию тучных клеток дыхательных путей и паренхимы легких человека *in vitro*, а также предотвращают раннюю реакцию на антиген, не подавляют развития поздней реакции.

Дж. Л. Монгар (J. L. Mongar)

Система комплемента выполняет несколько основных функций в механизме защиты организма. Кроме опсонизации и лизирования бактерий и нейтрализации вирусов, она является главной гуморальной эффекторной системой воспаления. Об участии иммунной системы в эффектах комплемента известно со времени зарождения иммунологии, но впоследствии это направление развивалось не столь интенсивно. Было установлено, что для лизиса чужеродных клеток необходима кооперация между сывороточными факторами, но предполагалось, что роль факторов сводится к усилению или комплементации иммунной системы. В настоящее время эта точка зрения изменилась и реакция антиген-антитело рассматривается лишь как один из многих (хотя и наиболее специфичных) путей, ведущих к сложному ряду различных событий в каскаде сывороточных белков, известных в совокупности как комплемент.

В данной главе описаны структура и функции этих компонентов. Конечной точкой в последовательности событий является лизис внедрившихся в организм бактерий, однако в ходе этих событий образуются различные продукты, оказывающие важное влияние на собственные клетки организма. Некоторые продукты являются хемотаксинами, привлекающими нейтрофилы и лимфоциты, другие вызывают выделение гистамина и прочих медиаторов из тучных клеток, увеличивая тем самым кровоток; часть продуктов опсонизирует микроорганизмы.

Недавнее открытие роли нейтрофилов в опосредованных комплементом изменениях проницаемости обсуждается в главе 16. Сравнительно недавно описана солибилизация иммунных комплексов под действием комплемента. Рецепторы для компонентов комплемента в настоящее время идентифицированы на большинстве циркулирующих клеток, включая лимфоциты и эритроциты. Существует по крайней мере пять типов рецепторов, но их функции пока не полностью определены.

Компоненты комплемента

Одиннадцать белков, циркулирующих в крови, составляют ортодоксальный, или классический, каскад; они обозначаются как C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, ... C9. В этом порядке и происходит реакция. Два других белка, обозначаемых как В и D, опосредуют альтернативный путь. Более того, по крайней мере 6 других белков участвуют как регуляторы каскада и не менее 6 биологически активных фрагментов могут отщепляться от исходных белков.

На рис. 54 показана схема основных реакций комплемента: неактивный компонент комплемента расщепляется серинэстеразой на большой и малый фрагменты. Первый уже сам по себе является новой эстеразой серина. Этот фермент необычен тем, что его активность сохраняется при присоединении молекулы к клеточному рецептору (мембраны). Ферментативно активный центр образуется на C1r, C1s, C2 (модифицированных C3 и/или C4), В и D. Активные формы обычно отмечены черточкой над буквенным и цифровым обозначением.

Комплекс C1 представляет собой высокоактивную ферментативную систему. Первым из белков, расщепляющихся данной системой, является C4, за ним следуют C2, C3 и C5, которые впоследствии активируются. Последние 5 компонентов прикрепляются к клеткам, не являясь мишенями ферментов. Они принимают участие в образовании ионных каналов в мембране.

Белки комплемента являются глобулинами с молекулярной массой около 100 000 и составляют значительную часть сывороточного белка — примерно 3 мг/мл, более половины из которых приходится на C3 (табл. 10). Возможно, что клеточным источником большинства белков комплемента являются макрофаги, особенно в печени и селезенке. Большинство компонентов имеет очень высокую скорость обмена, около половины из них ежедневно замещается. Скорость их обмена значительно выше, чем у других белков плазмы, ввиду чего предполагается, что помимо обычных процес-



Рис. 54. Общая схема реакций каскада комплемента.

сов деградации, которые наблюдаются у всех плазменных белков, компоненты комплемента постоянно активируются и потребляются.

Прогресс в определении свойств белков комплемента зависит от двух различных методов их оценки. Во-первых, существует традиционное биологическое определение, включающее лизис эритроцитов барана, которые обрабатываются кроличьими антителами с последующим добавлением вероятных компонентов комплемента. В дополнение к этому в настоящее время осуществляется радиоиммунологический анализ, для успешного проведения которого необходимо приготовление чистых компонентов, затем получение специфических антител к ним и, наконец, мечение антител радиоактивным йодом без нарушения их активности. В последующих исследованиях стали играть главную роль моноклональные антитела.

Таблица 10. Молекулярная масса и сывороточная концентрация компонентов комплемента

Белок	Молекулярная масса, $\times 10^3$	Концентрация, мкг/мл
C1q	400	190
C1r	83	100
C1s	83	ПО
C4	206	400
C2	117	25
C3	180	1200
C5	180	80
C6	128	60
C7	121	60
C8	154	80
C9	79	230
B	93	200
D	24	1

Действие каскада будет описано поэтапно: 1) реакция C1-компонентов с комплексом антиген-антитела, в результате которой образуется иницирующая единица (классический путь); 2) ферментативная атака на C3 и C5; 3) альтернативный путь активации комплемента; 4) атака на мембрану клетки комплекса пяти последних компонентов.

Иницирующая единица

Первый компонент комплемента-C1q-является самым большим и наиболее сложным из белковых компонентов и обладает уникальной конфигурацией. Его молекулярная масса равна 400 000, а белок состоит из 18 пептидных цепей. Выделяют три типа пептидных цепей, обозначаемых А, В и С; все они очень сходны между собой и, комбинируясь, образуют 6 субъединиц. Необычной характеристикой их строения является то, что около 80 аминокислотных остатков с N-конца (примерно две пятых каждой цепи) совпадают со структурой, типичной для молекулы коллагена. Эти N-концы связаны в один пучок. С-концы остаются дискретными группами трех цепей в форме глобулярного протеина. Общий вид молекулы при электронной микроскопии напоминает пучок тюльпанов с собранными вместе нижними половинами стеблей и расходящимися верхними половинами, которые дают по 6 ответвлений, каждое из которых заканчивается глобулярной головкой (рис. 55, а). Головки являются распознающими единицами, которые прикрепляются к комплементсвязывающим центрам в Fc-области иммуноглобулина. Этот центр экспрессируется только при поперечном связывании молекул антител с антигеном. В типич-

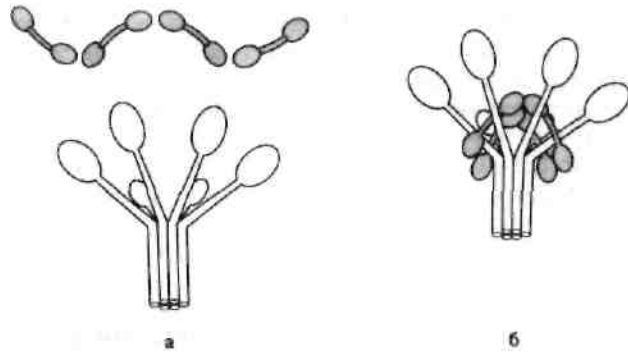


Рис. 55. Модель первого компонента комплемента.

а-составляющие молекулы: внизу-C1q, вверху- 2C1r и 2C1s; б-сборка этих пяти молекул. Атом кальция также участвует, но его позиция в комплексе не определена.

ном случае антиген является компонентом клеточной мембраны. IgM гораздо активнее фиксирует комплемент, чем IgG, вероятно, вследствие взаимодействия с несколькими глобулярными головками.

C1r и C1s являются ферментативными компонентами иницирующей единицы. Каждый из них представляет собой единичную гантелеподобную пептидную цепь с молекулярной массой 83 000 и аналогичным аминокислотным составом. По две молекулы C1r и C1s образуют комплекс вокруг иона кальция и активируются при абсорбции на C1q возле глобулярных головок (рис. 55,б). C1s обладает серинэстеразной специфичностью, отличной от специфичности плазмина. При ее действии на C2 и C4 образуются первые два компонента активирующей единицы (рис. 56). Описаны ингибиторы, блокирующие сборку ферментативного комплекса (C1q INH) или его действие (O INH).

Активирующая единица

Активирующая единица состоит из C2, C3 и C4, причем последовательность начинается

с C4. После C1q наиболее крупным белком в каскаде комплемента является C4, но он весьма прост по своей структуре. Вначале он, вероятно, представляет собой одиночную пептидную цепь с молекулярной массой 206000 дальтон и является основным компонентом комплемента (400 мкг/мл в сыворотке). При превращении в активный C4 под действием C1s он теряет небольшой биологически активный фрагмент C4a. C2 также состоит из одной полипептидной цепи, которая вдвое короче, чем у C4. В сыворотке C2 присутствует в следовых количествах (25 мкг/мл). Под действием C4 он расщепляется на энзиматически активную единицу C2 (молекулярная масса 70000) и меньший фрагмент (C2b) с неизвестной биологической активностью. C2 слабо взаимодействует с C4.

С нашей точки зрения, комбинация C4 и C2 формирует наиболее важный фермент в системе. Он является C3-конвертазой, а его уникальный субстрат содержится в избытке (1200 мкг/мл в сыворотке). Продукты, образующиеся в результате его действия (C3 и фрагмент C3a), играют важную роль в воспалительной реакции. От а-цепи C3 отщепляется

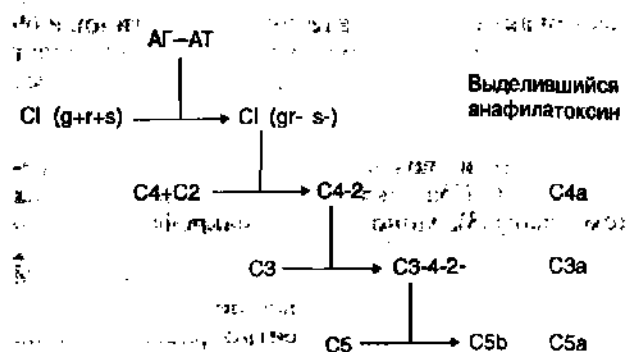


Рис. 56. Стадии инициации и активации каскада (только классический путь). Черточки над комплексом указывают на наличие ферментативной активности.

ряд фрагментов: C3c, C3d, C3dg и C3e. Только последний из них заслуживает особого внимания, хотя все фрагменты реагируют с одним или несколькими рецепторами на поверхности эритроцитов и лейкоцитов. C3e представляет собой 101-аминокислотный пептид, участвующий в высвобождении лейкоцитов из костного мозга в циркуляцию.

Наиболее важными из небольших фрагментов являются C3a, C4a и C5a-анафилактоксины, или пептиды, высвобождающие гистамин. В настоящее время установлена их аминокислотная последовательность. В состав C3a и C4a входят 77 аминокислотных остатков. Из 74 аминокислот, составляющих C5a, 29 гомологичны таковым C3a; кроме того, C5a содержит углеводный компонент. Все они отщепляются от α-цепи исходной молекулы и обладают C-конечным аргинином, который необходим для активности, индуцирующей выделение гистамина. C4a, будучи структурно близким к C3a, действует на те же клеточные рецепторы, но с гораздо более низким аффинитетом (около 1%), что обусловлено наличием у него двух разных аминокислот в C-терминальном пентапептиде. Это было подтверждено в исследованиях с перекрестной десенситизацией. C3a и C4a проявляют функциональные свойства, которые не обнаруживаются у C5a. Синтетический пептид (C3a, 57-77), по своим размерам составляющий примерно четвертую часть C3a, почти эквивалентен ему по активности. C-терминальный пептид (C3a, 73-77) тоже активен. Напротив, синтетические пептиды, полученные на основе структуры C5a, не обладают биологической активностью, что свидетельствует о нашем недостаточном знании комбинированного центра данного анафилактоксина. Нам известно, что он отличается от центра для C3a/C4a, поскольку это показано перекрестной десенситизацией стимулированных тканей и конкурентным связыванием на изолированных клетках. Отсутствие биологической активности синтетических пептидов и 69 N-концевых остатков молекулы позволяет предположить, что рецептор взаимодействует с многочисленными центрами на C5a. Рецептор для C3a/C4a обнаружен на тучных клетках, базофилах и, возможно, на нейтрофилах; рецептор для C5a также выявлен на нейтрофилах (см. главу 3), моноцитах и макрофагах.

Образование C3-конвертазы относится к неэффективным процессам: большинство C4 и C2 инактивируется в сыворотке, но некоторое количество C3 ковалентно фиксируется на

антителах вблизи клеточной мембраны. Эта фиксирующая система способна расщеплять C2 и захватывать некоторое его количество, образуя, таким образом, комплекс C3-конвертазы. C3, как и C4, связывается с фиксированным (закрепленным) антителом. В обеих конвертазах (C3 и C5) активный протеолитический центр расположен на C2-компоненте комплекса. Другой тип C3-конвертазы поставляется альтернативным путем.

C3 модифицирует комплекс C4-2 таким образом, что он представляет ферментативную активность для следующего компонента, становясь C5-конвертазой. Активность C5b, напротив, ограничена экспозицией центра, присоединяющегося к клетке. Эти события проиллюстрированы на рис. 56.

Альтернативный путь

Выше описан только классический путь, ведущий к атаке мембраны. Функционирование альтернативного, пропердинового пути концентрируется вокруг комплекса C3 с новым ферментативным компонентом, фактором В. Комплекс активируется тринадцатым членом каскада, фактором D, который отщепляет фрагмент Ba (от В, увеличивая C3В). При адекватном поступлении фактора В образуется больше C3-конвертазы и, следовательно, больше C3. При добавлении к комплексу C3-В одной или нескольких молекул C3 происходит образование C5-конвертазы. Конечно, в циркуляции существуют контролирующие механизмы для остановки активированных C3. В них участвуют два ингибитора-Н и I (ранее называвшиеся В ИН и КАФ), которые связываются с C3 и расщепляют его до неактивной молекулы C3Ы, ограничивая тем самым поступление конвертазы. Предоставленный самому себе комплекс диссоциирует. Пропердин (П), по названию которого первоначально был обозначен путь, в настоящее время рассматривается как следующий регулирующий фактор, который стабилизирует комплекс, замедляя диссоциацию В и C3 и, следовательно, увеличивая время полураспада с 1,5 до 18 мин.

Подтверждение существования этого альтернативного пути получено недавно в экспериментах, показавших, что лизис эритроцитов с ожидаемой скоростью возникает при смешивании чистых белковых компонентов. Система состоит из C3, факторов В и D с пятью белками мембранной атаки C5 - 9 и регуляторами П (Н и I).

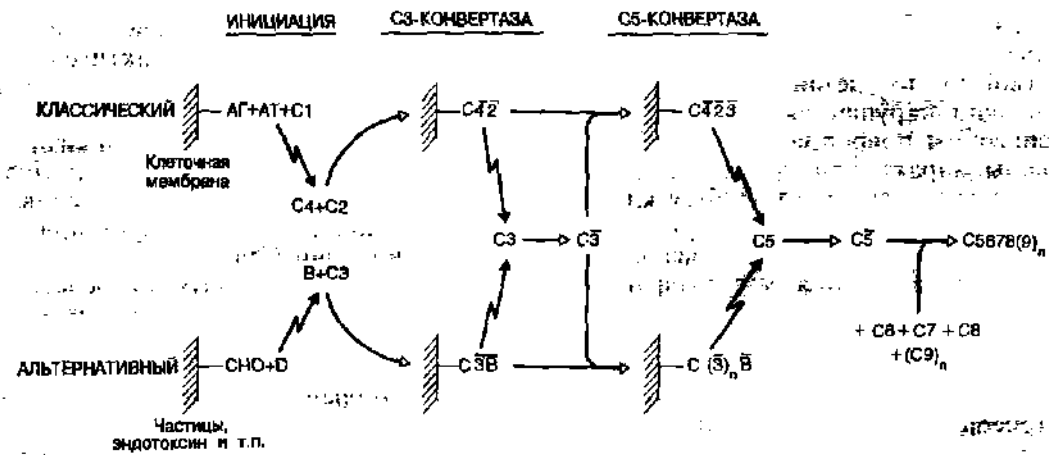


Рис. 57. Сравнение классического и альтернативного (пропердинового) путей.

На рис. 57 показаны альтернативный и классический пути к мембранной атаке. Иницирующая стадия обычно характеризовалась как иммунологическая для классического пути и неиммунологическая—для альтернативного, поэтому последний действовал в промежутке времени между первым проникновением бактерий и появлением антител—примерно одну неделю. Недавно показано, что различие между двумя путями не является абсолютным. Некоторые макромолекулы (вирусы, токсины или даже кристаллы уратов) способны запускать классический путь даже при отсутствии иммунного ответа. Соответственно альтернативный путь, обычно активируемый бактериальными полисахаридами, может также запускаться комплексами антиген-антитело или агрегированными иммуноглобулинами.

Каскад комплемента может запускаться и другими механизмами, помимо двух описанных выше. Активированный фактор Хагемана способен активировать С1 и, возможно, С5 (см. главы 1 и 13), а тромбин и плазмин, как и нейтральные протеазы, выделяемые нейтрофилами и макрофагами, могут действовать как С3-конвертирующие ферменты (см. главу 1).

Структура мембранной атаки

I Стадия образования С5а подводит нас к концу ряда биологических эффектов, непосредственно связанных с воспалительной реакцией; дальше следует краткое описание конечных стадий каскада комплемента, в частности механизм гибели клеток с прикрепившимся к ним С5b.

Интересно, что этот процесс не является ферментативным: в клеточном лизисе не участвует расщепление белковых или углеводных цепей, он происходит в результате изменений проницаемости клеточной мембраны.

Компонент С5b, образованный фиксированным к клетке С4.2.3, обладает временным аффинитетом к С6, с которым он образует стабильный бимолекулярный комплекс. Затем прикрепляется С7 (белок, весьма напоминающий С6), и тримолекулярный комплекс приобретает переходную способность фиксироваться к мембране. Добавление финальных компонентов приводит к образованию замечательного комплекса, содержащего гидрофобные области, способные связывать более 1000 молекул фосфолипидов. Эта способность позволяет ему включаться в состав клеточной мембраны и образовывать ионные каналы. В окончательной форме комплекс имеет вид (С5b.6.7.8.9), где n может достигать 10. Молекулы С9 могут образовывать в мембране каналы диаметром до 10 мкм.

Сывороточный компонент, называемый S-белком, может действовать как альтернативный связывающий участок; следовательно, он способен функционировать в качестве ингибитора системы мембранной атаки.

Клетки неспособны сохранять свою целостность и функционировать при включении в мембрану данного комплекса. В случае эритроцитов, которые используются в большинстве исследований *in vitro*, происходит коллоидный осмотический лизис; измерение количества выделенного гемоглобина показывает число по-

врежденных клеток. Что касается бактериальных клеток, ригидность стенки может препятствовать их дезинтеграции, но их функция обычно нарушается. Бактериальные токсины способны повреждать мембраны, образуя каналы, характерные для комплекса C5-9. Если же комплементом атакуются клетки собственного организма, как при аутоиммунных заболеваниях, то могут последовать серьезные тканевые повреждения, что возвращает нас в область воспалительной реакции.

Комплемент и воспаление

Теперь мы имеем возможность детально рассмотреть провоспалительное действие продуктов каскада комплемента, большинство из которых упоминалось выше. В основном это небольшие фрагменты или отщепленные пептиды, которые выделяются активирующей единицей при функционировании каскада и включают по крайней мере C3a, C4a, C5a, C3e, B и C2-КИНИН (см. ниже); все они имеют молекулярную массу порядка 10000. Кроме того, к ним относят большой фрагмент C3, называемый C3b, и его слегка модифицированная версия C3bi, образующийся из C3b под действием фермента (инактиватора C3b, или фактора I).

C2b активен как опсонин; он прикрепляется к микроорганизмам, а затем к нейтрофилам, моноцитам и макрофагам (которые обладают рецепторами CR1 для этого фрагмента), что приводит к фагоцитозу. Процесс становится более эффективным за счет образования дополнительной связи между фагоцитом и микроорганизмом, которая включает специфическое антитело. C3b также связывается со всеми лейкоцитами при помощи самостоятельного рецептора CR2. Он, по-видимому, имеет важное значение для ограничения пролиферации лимфоцитов. Особенно много рецепторов к C3b на эритроцитах. Связанный таким образом C3b играет важную роль в клиренсе иммунных комплексов в печени.

Все три анафилатоксина-C3a, C4a и C5a связываются и оказывают влияние на функции практически всех циркулирующих клеток, а также многих типов тканевых клеток, в том числе тучных, альвеолярных макрофагов и гладкомышечных клеток различных тканей. Клеточные реакции на анафилатоксины включают в себя хемотаксис, нарушение прикрепления, стимуляцию метаболизма и выделение вторичных медиаторов. Все четыре эффекта

были изучены на нейтрофилах (см. главу 3), на которых особенно активен C5a. ЕД₅₀ для связывания, хемотаксиса и выделения ферментов составляет примерно 5 нМ. Изолированные ПМЯЛ становятся липкими после обработки C5a. Данный феномен *in vivo* принимает участие в механизмах, обуславливающих лейкопению, возникающую при образовании или инфузии C5a.

Хорошо изучено действие анафилатоксинов, которое обуславливает повышение проницаемости. У людей внутрикожное введение менее 0,1 пкМ C5a приводит к образованию волдыря. Среди известных пептидов наиболее активен в этом отношении C5a. Вещества, вызывающие образование волдыря (в порядке уменьшения их активности): C5a > C5a-дез-арг > C3a > гистамин/брадикинин > C4a. C4a обладает примерно 1/2000 частью активности C5a. Предполагается несколько механизмов данного эффекта. Главная роль нейтрофилов в этом процессе обсуждается в главе 17. Простагландины и лейкотриены могут играть определенную роль, как и выделение гистамина тучными клетками. У человека анафилатоксины быстро инактивируются в сыворотке, в основном карбоксипептидазой N.

Анафилатоксины являются не только фрагментами с биологической активностью: C3e, например, как уже отмечалось, может также мобилизовывать лейкоциты из костного мозга. Кроме того, они повышают проницаемость сосудов кожи, что создает фрагмент C2, называемый C2-КИНИНОМ (согласно принятой системе, его следовало бы назвать C2c). Большой фрагмент фактора В_В, который рассматривался при описании C3-конвертазы альтернативного пути, вызывает распластывание макрофагов в результате ферментативной атаки на C5, связанный с мембраной.

Малый фрагмент (Ba) вызывает хемотаксис нейтрофилов. Взаимодействие различных фрагментов с лейкоцитами показано на рис. 58. Помимо указанных эффектов, анафилатоксины обладают прямым стимулирующим действием на гладкие мышцы.

Клинические исследования у больных с дефицитом комплемента подтверждают многообразие его функций. Снижение уровня функционального C1 INH ведет к перепроизводству фактора проницаемости C2-кинаина и к заболеванию- врожденному ангионевротическому отеку. Наиболее типичной формой дефицита комплемента (частота 1:10000 человек) является отсутствие C2. Это часто сопровождается

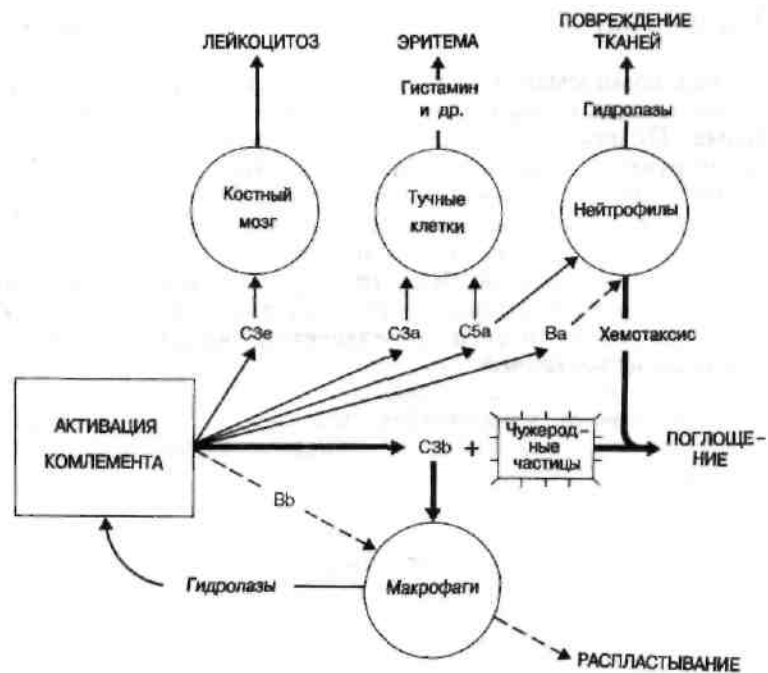


Рис. 58. Взаимодействие фрагментов комплемента с лейкоцитами.

системной красной волчанкой, при которой происходит отложение комплексов антиген-антитело, что, возможно, связано с неспособностью патологического комплемента вызывать их растворение.

Отсутствие синтеза С3 - редкий, но серьезный дефицит, иллюстрирующий роль данного компонента. Сыворотка крови в таких случаях не опсонизирует (отсутствие С3b) или не лизирует бактерии (нет мембранной атаки). Поскольку при этом отсутствует С3e, не происходит мобилизации лейкоцитов, а в связи с отсутствием С5a гранулоциты не доставляются к месту инфекции.

Не менее показательны и отсутствие инaktivатора С3b. Его дефицит обуславливает очень низкий уровень С3 и В в сыворотке: весь С3 превращается в С3a и С3b. Люди с таким дефицитом чувствительны к бактериальным инфекциям, у них часто возникает крапивница, возможно, в связи с выделением гистамина в коже под действием С3a. Больные с недостатком терминальных компонентов также чувствительны к бактериальным инфекциям, хотя опсонизация и фагоцитоз микроорганизмов протекают нормально. Это служит еще одним свидетельством важности бактериолиза как части защиты организма.

Для изучения механизмов действия комп-

племента используются С4-дефицитные морские свинки и С5-дефицитные мыши.

Как подчеркивалось в главе 1, при эффективном протекании реакций воспаления наблюдается элиминация патогена или болезнетворного микроорганизма. При неадекватной реакции защитные силы сами становятся составной частью патологического процесса. Система комплемента может участвовать в повреждении тканей, особенно при заболеваниях с иммунными комплексами, при которых каскад комплемента запускается неадекватно. Это наблюдается при некоторых формах гломерулонефрита, артериита, пневмонита, увеита и при различных заболеваниях соединительной ткани, включая ревматоидный артрит. В качестве запускающих антигенов могут выступать собственные антигены организма (аутоаллергические реакции) или чужеродные антигены бактерий, вирусов или гельминтов. При многих из этих заболеваний ткани повреждаются полиморфно-ядерными нейтрофилами, привлекаемыми С5a, однако при некоторых патологических состояниях определяется тип антителоопосредованной цитотоксичности, когда повреждения вызываются литическими компонентами комплемента. Такая ситуация возникает при некоторых формах гемолитической анемии, агранулоцитоза и др.

Заключение

Каскад комплемента является одним из наиболее мощных инструментов защиты организма. Помимо опсонизации и лизиса в нем генерируются мощные медиаторы, которые прямо или опосредованно участвуют в сосудистых изменениях, накоплении и(или) активации тучных клеток, полиморфно-ядерных лейкоцитов и макрофагов. Все эти формы активности при неадекватном запуске защитных механизмов могут внести определенный вклад в повреждение тканей.

I. Система образования кининов

P.K. ВИГИНС, КГ. КОХРЕЙН (R.C.
WIGGINS, C.G. COCHRANE)

Кинины-это небольшие полипептидные молекулы, которые обладают многими свойствами, включающими сокращение или расслабление гладких мышц, повышение сосудистой проницаемости и генерирование боли. Выделяют три основные группы кининов: брадикинины, кинины животного происхождения и лейкоконины. Особое внимание здесь будет уделено брадикининам, а в конце главы приводится краткое описание двух последних типов кининов. Специфические функции кининов рассматриваются в тексте применительно к человеку.

Брадикинины

Брадикинины являются небольшими пептидами (9-11 аминокислот), высвобождающимися из исходных молекул кининогенов протеиназами (калликреинами). Они обладают уникальной способностью повышать сосудистую проницаемость, вызывая при этом расширение артериол и сужение вен. Таким образом кинины облегчают переход жидкости из сосудистого русла во внесосудистое пространство. Брадикинины инактивируются ферментами (кининазами), которые удаляют С-концевую(ые) аминокислоту(ы). Кинины могут быть медиаторами некоторых эффектов при воспалении.

Структура брадикининов

Схема образования и разрушения кининов дана на рис. 59, а на рис. 60 показана аминокислотная последовательность брадикинина.

кислотная последовательность двух основных брадикининов-собственно брадикинина и лиз-брадикинина (каллидина). Из мочи выделен другой кинин-мет-лиз-брадикинин. Брадикинины имеют общую С-концевую последовательность, и их инактивация происходит в результате удаления одной С-концевой аминокислоты (карбоксипептидазой N, называемой также кининазой I) или двух аминокислот (пептидилдипептидазой, или кининазой II) (см. главу 8). Брадикинин отщепляется от исходной молекулы кининогена калликреинами плазмы.

Кининогены

В плазме присутствуют две формы кининогена: высокомолекулярный и низкомолекулярный кининогены. Некоторые важные характеристики обеих форм кининогена приведены в табл. 11.

Структура высокомолекулярного кининогена показана на рис. 61. Брадикинин отщепляется от молекулы в виде двух цепей, имеющих дисульфидные связи. Тяжелая цепь (N-конец) несет антигенные детерминанты, аналогичные таковым низкомолекулярного кининогена. Легкая цепь (С-конец) свойственна только высокомолекулярному кининогену и обладает двумя важными дополнительными характеристиками. Во-первых, в ней имеется область, обогащенная гистидином, с помощью которой молекула присоединяется к отрицательно заряженным поверхностям. Во-вторых, на легкой цепи находится связывающий центр (на рис. 61 он не показан) для прекалликреина (предшественник профермента плазмы калликреина) или, альтернативно, для фактора XI

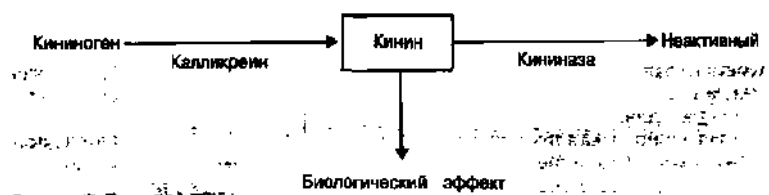


Рис. 59. Механизм образования и разрушения кининов.

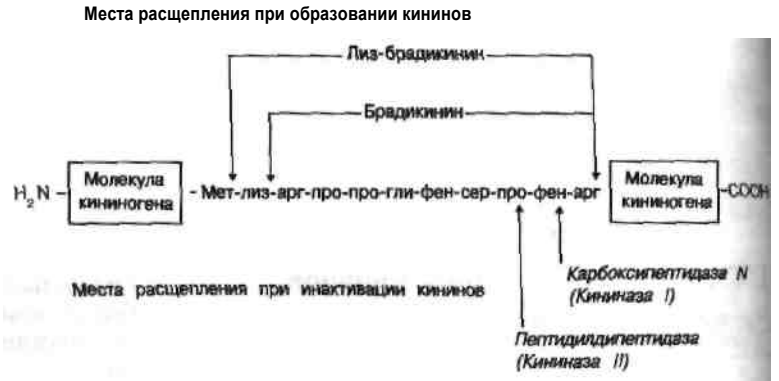


Рис. 60. Аминокислотная последовательность брадикинина. В верхней части рисунка указаны места протеолитического расщепления при образовании брадикинина, в нижней — места расщепления при его инактивации.

(второй профермент во внутреннем коагуляционном каскаде, который ведет к образованию фибрина в плазме). Участок взаимодействия между высокомолекулярным кининогеном и прекалликреином находится на легкой цепи высокомолекулярного кинина. Образуется комплекс высокомолекулярный кининоген-прекалликреин или высокомолекулярный кининоген-фактор XI. Возможная значимость комплексов состоит в активации компонентов контактной системы или фактора Хагемана, что обсуждается ниже. (Фактор Хагемана, или фактор XII, является первым проферментом в коагуляционном каскаде.)

Калликреины

Многие ферменты, например трипсин и плазмин, способны высвободить кинины из кининогенов. Термин «калликреин» обозначает кинингенерирующий фермент, хотя первоначально он использовался для определения только кинингенерирующего фермента из поджелудочной железы. Калликреины — это трипсинопод-

обные протеиназы серина, которые обнаруживаются во многих органах: в поджелудочной железе, почках, слюнных железах, толстом кишечнике, коже, крови. В настоящее время имеется подробное описание только двух калликреиновых систем: калликреин-фактор Хагемана и тканевая калликреиновая система. Из табл. 12, где даны характеристики обеих систем, видно, что плазменные и тканевые калликреины весьма различны: это разные и не связанные между собой ферменты.

Тканевые калликреины. Тканевые калликреины почек, поджелудочной железы, бронхолегочных тканей и слюнных желез родственны между собой по антигенному составу, но отличаются от калликреинов плазмы и кожи. Тканевые калликреины высвобождают лиз-брадикинин из кининогенов, а их физиологическая роль, возможно, заключается в контроле движения жидкости из сосудистого русла в экзо-

Таблица 11. Сравнительные характеристики высоко- и низкомолекулярного кининогена

	Высокомолекулярный кининоген	Низкомолекулярный кининоген
Приблизительная молекулярная масса	110 000	70 000
Концентрация в плазме, мкг/мл	70	400
Субстрат для:		
плазменного калликреина	+	-
тканевого калликреина	+	+

Таблица 12. Плазменный и тканевой калликреин: сравнительные данные

	Плазменный калликреин	Тканевой калликреин
Приблизительная молекулярная масса	85 000	40 000
Концентрация в плазме, мкг/мл	50	< 1
Распределение	Кровь Внесосудистое пространство	Почки Поджелудочная железа Слюнные железы
Кининогеновый субстрат	Высокомолекулярный кининоген	Низко- и высокомолекулярный кининоген
Образующийся кинин	Брадикинин	Лиз-брадикинин

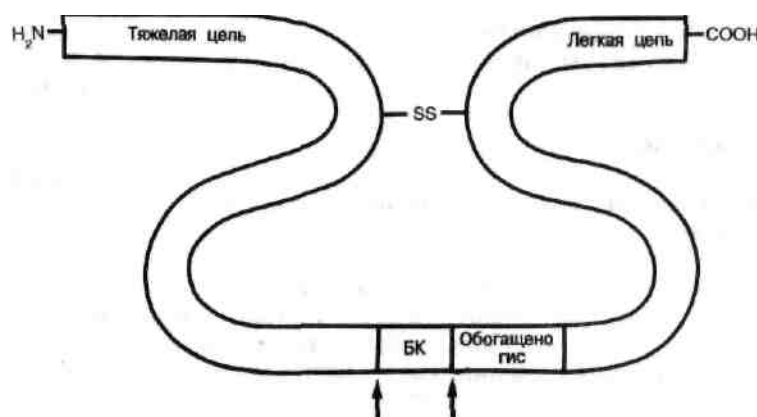


Рис. 61. Схематическая структура высокомолекулярного кининогена, которая показывает место нахождения брадикинина (БК) в непосредственной близости от обогатенной гистидином области легкой цепи расщепленной молекулы (по Нап и др., 1976).

кринные железы и почки. Недавние исследования показали, что тканевой калликреин может также активировать гормоны и р-фактор роста нервов посредством расщепления прогормона при секреции. Калликреин мочи, кроме того, активирует проренин. Таким образом, семейство родственных ферментов обладает разнообразными внутри- и внеклеточными функциями, не связанными с образованием кининов.

Калликреиновая система плазмы калликреин-фактор Хагемана. В табл. 13 приведены сведения о прекалликреине плазмы, проферменте плазменного калликреина (форма, в которой эта молекула циркулирует в плазме). Два других профермента, фактор Хагемана (фактор XII) и фактор XI системы коагуляции, а также C1г и C1s системы комплемента (см. главу 12) обладают очень сходной структурой, механизмом активации, одним ингибитором (C1-ингибитор), что позволяет предположить редупликацию гена при их эволюционном развитии.

Таблица 13. Характеристики плазменного прекалликреина и фактора Хагемана

	Прекалликреин	Фактор Хагемана
Молекулярная масса	85000	80000
Активационные фрагменты	50000	50000
Трипсиноподобные сериновые протеиназы	30000	30000
Инактивация ингибитором C1	+	+
Концентрация в плазме, мкг/мл	+ 50	+ 25

Активация плазменного прекалликреина фактором Хагемана происходит при наличии отрицательно заряженной поверхности. На рис. 62 дана схема молекулярного механизма действия высокомолекулярного кининогена в качестве кофактора при взаимодействии фактора Хагемана и прекалликреина на такой поверхности. Таким образом, источник кинина, родительская молекула кининогена, циркулирует в комплексе с предшественником фермента, который может выделять тот же кинин. Поверхность облегчает действие и активацию фактора Хагемана и прекалликреина с последующим образованием кинина. На рис. 63 показаны некоторые другие из возможных последовательностей активации фактора Хагемана, которые могут иметь важное значение при воспалении. К ним относится превращение проренина в ренин и плазминогена в плазмин, а также C1 (а возможно, и C5) системы комплемента и активация как внутренней, так и внешней коагуляционных систем.

Многие отрицательно заряженные вещества могут служить поверхностью, на которой облегчаются взаимодействие и активация фактора Хагемана и прекалликреина. К ним относятся гликозаминогликаны, бактериальные липополисахариды, гломерулярная базальная мембрана, коллагены, эластины и кристаллы уратов натрия. Они могут появляться или выделяться при воспалении, облегчая тем самым активацию фактора Хагемана.

Клеточные ферменты. Базофилы и тучные клетки при активации анти-IgE антителами или антигеном выделяют фермент (протеиназу серина), способствующий образованию кинина из кининогена. Это обеспечивает прямую связь между аллергией и образованием кинина. Эн-

дотелиальные клетки кроликов также обладают ферментом, активирующим фактор Хаге-мана.

Кининазы

Кининаза II (ангиотензинконвертирующий фермент)

Этот металлофермент, содержащий цинк, является пептидидипептидазой с молекулярной массой примерно 150000, который отщепляет две С-концевые аминокислоты (фен-арг) от

брадикининов, таким образом инактивируя их. Активный фермент локализуется на люминальной поверхности эндотелиальных клеток. Примерно половина кининазы II организма находится в легких, которые в связи с этим являются главным местом метаболизма кининов. Данный фермент также отщепляет две С-терминальные аминокислоты от ангиотензина I, превращая его в ангиотензин II, мощный сосудосуживающий пептид. Аффинитет кининов к ферменту в 100 раз выше, чем у ангиотензина I (K_m - 10^{-7} и 10^{-5} соответственно). Следовательно, брадикинин может

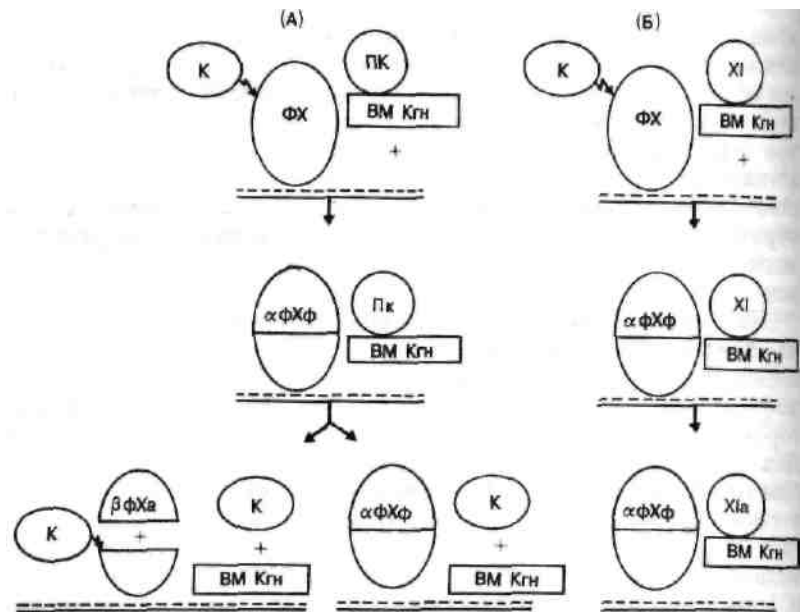


Рис. 62. Молекулярная модель контактной активации системы фактора Хагемана. Показаны два (А и Б) альтернативных пути. Отрицательно заряженные поверхности изображены в нижней части каждой диаграммы. Для обозначения молекул используются следующие сокращения: фХ-фактор Хагемана; фХа-активированный фактор Хагемана; ПК-прекалликреин; К- калликреин; XI-фактор XI системы коагуляции; XIa-активированный фактор XI; VM Кгн-высокомолекулярный кининоген.

Схема А. верх: фХ связывается с отрицательно заряженной поверхностью. Комплекс ПК и VM Кгн в растворе представляет отрицательно заряженную поверхность. фХ на поверхности чувствителен к ферментативному расщеплению и активации (отмечено зигзагообразной стрелкой). В расщеплении фХ в плазме наиболее часто участвует калликреин, показанный здесь как расщепляющий фермент; однако возможно вовлечение и других ферментов. Хотя это никак не обозначено, калликреин действует значительно активнее, когда VM Кгн связан непосредственно с фХ. Средняя и нижняя диаграммы: фХ активирует ПК с образованием К. Нижняя диаграмма: фХ расщепляется в месте 2 с образованием р-фХа (активный фрагмент с м. м. = 28000), который выделяется в супернатант. В альтернативном представленному на схеме А случае фХ расщепляется только в месте 1 (т.е. в пределах дисульфидной петли) и затем в виде а-фХа остается присоединенным к поверхности. Схема Б: фХ присоединяется к поверхности и активируется ферментом, чаще всего калликреином. VM Кгн и ПК присоединяются к его связям к поверхности. На средней и нижней диаграммах фХа в форме а-фХа, расщепленного в месте 1, затем расщепляет и активирует фактор XI системы коагуляции, который присоединяется к поверхности рядом с фХ с помощью VM Кгн. а-фХа и XIa в основном остаются связанными с поверхностью [Cochrane, Griffin.- Amer. J. Med., 1979, 67, 657].



Рис. 63. Возможные пути активации системы фактора Хагемана.

и косвенно влиять на сосудистый тонус, успешно конкурируя с ангиотензином I за фермент кининазу II. Ингибиторы кининазы I, производные пептидов из змеиного яда (например, SQ 20881) оказались чрезвычайно полезными при определении значимости инактивации брадикинина и образования ангиотензина II в различных условиях, например, при разных типах шока и при регуляции артериального давления.

Карбоксипептидаза N (кининаза I, карбоксипептидаза B, инактиватор анафилатоксина)

Металлофермент, содержащий цинк, с молекулярной массой около 300000, присутствует в плазме в концентрации 30-40 мкг/мл. Он отщепляет С-концевые основные аминокислоты у некоторых биологически активных пептидов-брадикинина, лиз-брадикинина, фибринопептидов, С3а, С4а и С5а. Вероятно, карбоксипептидаза N является главным инактиватором С3а, С4а и С5а в плазме, но кинины инактивируются ею значительно медленнее.

Другие клеточные пептидазы также могут инактивировать брадикинин или ангиотензин; их значимость еще предстоит определить.

Фармакологические эффекты кининов

Кинины могут давать расслабление или сокращение гладких мышц различных органов, увеличивать проницаемость сосудов и вызывать боль. Кроме того, кинины обладают рядом других эффектов (см. Fujii et al., 1979): например, они стимулируют пролиферацию различных типов клеток *in vivo* и *in vitro*,

включая тимоциты. Они оказывают как прямое действие, так и не прямое влияние через метаболиты арахидоновой кислоты, гистамин, серотонин, вазопрессин и катехоламины. Однако до настоящего времени не существует общепринятых взглядов на их роль в физиологии и в воспалении. В значительной мере это обусловлено неудачными попытками создания специфических ингибиторов калликреинов и аналогов брадикининов, которые позволили бы оценить вклад кининов в биологические процессы.

Рецепторы для кининов идентифицированы на различных клетках, они достаточно специфичны и обладают высокой константой диссоциации (10^{-9} M). Эти рецепторы модулируются стероидными гормонами. Механизм влияния кининов на клеточные функции пока неясен. Однако вследствие взаимодействия с клетками (предположительно через специфические рецепторы) брадикинин стимулирует метаболизм фосфатидилинозитола, а также арахидоновый обмен и метаболизм циклических нуклеотидов. В вызываемых брадикинином изменениях в клетке принимает участие кальций, однако механизмы внутриклеточной передачи сигнала еще не определены.

Действие кининов на кровеносные сосуды осуществляется, по крайней мере частично, через метаболизм арахидоновой кислоты. Так, взаимодействие кининов с рецепторами клеточной поверхности приводит к активации ацилгидролаз (например, фосфолипазы A_2), которые высвобождают арахидоновую кислоту из фосфолипидов. По-видимому, кинины влияют и на другие этапы метаболического пути арахидоновой кислоты, так как они избирательно увеличивают образование ПГЕ (ва-

зодилатор) в артериях и ПГФ (вазоконстриктор) в венах. Такое различие обусловлено, вероятно, активацией ПГЕ 9-кеторедуктазы кининами в венах. Возможно, что внутрисосудистые кинины не достигают гладкомышечных клеток, поскольку эндотелиальные клетки образуют относительно непроницаемый слой с высокой кининазной активностью. В то же время между эндотелиальными и подлежащими гладкомышечными клетками существуют тесные контакты. Так, кинины могут вызывать сокращение или расслабление мышц посредством внутриклеточных сигналов, например простагландинов. Эти передатчики действуют на протеинкиназы, зависимые от циклических нуклеотидов, которые регулируют взаимодействие актин-миозин-АТФ под влиянием кальмодулина.

Влияние кининов на сосудистую проницаемость осуществляется на уровне посткапиллярных венул, что было установлено при электронной микроскопии и радиоизотопных исследованиях. Увеличение проницаемости может быть связано с сокращением эндотелиальных клеток и расширением межклеточных сочленений и предупреждается агонистами (3-адренорецепторов. Этот процесс требует определенной энергии и, по-видимому, опосредуется простагландинами.

Другие медиаторы (такие, как гистамин), участвующие в воспалительном процессе, могут сильно изменить нормальную реакцию клеток на брадикинин. Поэтому эффекты брадикинина при воспалении нельзя рассматривать изолированно: здесь следует учитывать сложную сеть взаимодействующих медиаторов.

Физиологические эффекты кининов

Роль калликреин-кининовой системы в органах и в целостном организме животных изучена недостаточно и представлена совокупностью многих различных эффектов. Например, брадикинин в сердечно-сосудистой системе оказывает прямое действие на сердечную мышцу, вызывает расширение артерий и сужение вен, увеличивает число функционирующих капилляров и повышает проницаемость сосудов. Кроме того, брадикинин оказывает не прямое влияние через выделение катехоламинов и через нервные рефлексы, регулирующие частоту сердечных сокращений и сосудистый тонус. Ранее отмечались подобные эффекты брадикинина в легких, включая бронхосуживающее

действие. Кинины влияют также на метаболизм мышц, репродуктивные органы, функция желудочно-кишечного тракта и центральную нервную систему.

Брадикинин при воспалении и патологии

Хотя кинины способны вызывать классические признаки воспаления (отек, покраснение, жар и боль), технически невозможно прямо доказать, что они являются важными медиаторами воспаления. Отсутствие необходимой информации в значительной мере обусловлено следующим: а) отсутствием специфических антагонистов кининов или ингибиторов ферментов генерирующих кинины, хотя в настоящее время описаны предполагаемые антагонисты; б) не возможностью изменения скорости и амплитуды активации и инактивации кининов в области воспаления; в) вовлечением в большинство воспалительных явлений многих медиаторных систем (например, кинины, метаболиты арахидоновой кислоты, гистамин, серотонин, ангиотензин, С3а, С4а, С5а, свободные радикалы кислорода, продукты расщепления фибрина, протеолитические ферменты и др.).

Тем не менее существуют методы, позволяющие оценить состояние кинингенерирующих систем, например системы фактора Хагемана-прекалликреин-высокомолекулярный кининоген. Несмотря на относительную грубость этих методов, они дают возможность определить генерирование кининов при ряде состояний.

Наследственный ангионевротический отек — это врожденное доминантное аутосомное заболевание, проявляющееся повторными эпизодами отека и обусловленное отсутствием (или наличием дефектного) ингибитора С1. Ингибитор С1 является главным ингибитором активированного фактора Хагемана, калликреина плазмы, а также C1s и C1g системы комплемента. Во время эпизодов отека обнаруживается активация системы комплемента и системы фактора Хагемана. Недавние исследования показали, что независимо от вклада какой-либо из этих систем (или обеих) в формирование отека особо важную роль в развитии данного состояния играет контактная система (фактор Хагемана).

Подагра — это острый воспалительный артрит, вызываемый известным специфическим агентом-кристаллами уратов натрия. Кристаллы уратов натрия служат поверхностью для активации системы фактора Хагемана-

на. По имеющимся данным, фактор Хагемана активируется при подагре, а в воспаленном суставе определяется высокий уровень кининов. Вместе с тем известно, что кристаллы уратов натрия активируют комплемент, тромбоциты и нейтрофилы. Действительно, воспаление, вызванное введением уратов натрия в суставы собак, может быть устранено удалением нейтрофилов. Таким образом, роль различных механизмов в активации системы фактора Хагемана остается неясной.

Гипотензию и внутрисосудистую коагуляцию при септическом шоке и сыпном тифе связывают с активацией фактора Хагемана. Ряд данных свидетельствует в пользу активации системы фактора Хагемана у человека и экспериментальных животных при данных состояниях, что предполагает генерирование активных компонентов и кининов. Однако вклад выделившихся кининов в развитие данного синдрома неясен. Активированный фактор Хагемана способен вызывать гипотензию, что четко установлено у людей: при введении концентратов альбумина, загрязненных активированным фактором Хагемана, наблюдается резкое снижение артериального давления.

Недавно из жидкости, полученной при бронхиальном лаваже у больных бронхиальной астмой, вместе с лиз-брадикинином был выделен уникальный калликреин тканевого типа. Постоянное образование кинина при заболеваниях бронхов может играть первостепенную роль в возникновении бронхоспазма и, как правило, ведет к увеличению продукции метаболитов арахидоната и важных бронхоконстрикторных лейкотриенов. Изучение аллергического ринита показало, что в его развитии принимают участие лиз-брадикинин и брадикинин. После предъявления аллергена в начальном лаваже обнаруживаются кинины и калликреины, а также плазменные и тканевые кининогены, присутствующие во время аллергических симптомов.

Одним из главных симптомов острого панкреатита является выраженная гипотензия. Она вызывается сочетанием гиповолемии и выделения в циркуляцию гипотензивных веществ. Два панкреатических фермента-трипсин и калликреин-способны высвободить кинин из кининогена; активный калликреин поджелудочной железы идентифицирован в крови больных острым панкреатитом. Как показывают клинические исследования и эксперименты на собаках, данный кинин образуется при остром панкреатите, причем его фор-

мирование происходит преимущественно в брюшной полости, что приводит к накоплению перитонеальной жидкости и вызывает сильные боли.

Активация *in vitro* системы фактора Хагемана с последующим генерированием кининов, как и их внутрикожное введение, вызывают воспаление. Всего лишь 2,5 нг активированного фактора Хагемана повышает проницаемость сосудов. Такое количество фактора Хагемана составляет 0,01% его содержания в 1 мл плазмы. Установлено, что система фактора Хагемана является медиатором многих других состояний, включая аллергические реакции, карциноидный синдром, демпинг-синдром после гастрэктомии, заболевания коронарных артерий, внутрисосудистую коагуляцию, нефротический синдром и мигрень. Однако определить конкретный вклад образования кининов в общую воспалительную реакцию удается не всегда, что связано с отсутствием специфических антагонистов.

Наконец, не следует забывать, что отсутствие в циркуляции определяемых количеств высоко- и низкомолекулярных кининогенов (аутосомно-рецессивное наследование) может не иметь клинических проявлений. Хотя таких людей выявлено очень мало, у них нет явной тенденции к инфекциям или каким-либо симптомам дефицита воспалительных реакций. Более того, лица с дефицитом фактора Хагемана или калликреина не страдают от кровотечений и не имеют других явных признаков дефицита защитных механизмов. В то же время следует помнить, что первые описанные больные с дефицитом C2 были клинически здоровыми, хотя в настоящее время известно, что 50% таких больных страдают аутоиммунными заболеваниями.

Кинины немлекопитающих

В отличие от млекопитающих, у которых кинингенерирующие системы циркулируют в неактивной форме и активируются локально, в ядовитом мешочке ос и шершней присутствуют активные кинины. Кожа амфибий также чрезвычайно богата активными брадикининами. Неизвестно, правда, насколько важны такие кинины, служат ли они для защиты организма, для транспорта или других целей.

Кинины немлекопитающих обладают частичной гомологией с брадикинином.

Лейкокинин

Лейкокинины представляют собой кислые гипотензивные полипептиды, содержащие 21-25 аминокислот, которые вызывают сокращение или расслабление гладких мышц *in vitro*, а также повышение сосудистой проницаемости. Они образуются из лейкотриенов клеточной кислотой протеиназой, которая почти определенно является лизосомным ферментом катепсина D. Субстрат, лейкокиноген (молекулярная масса 41 000), обнаруживается в асцитной жидкости и не определяется в нормальной плазме, где он может образовываться при прогревании в течение 30 мин при 57 °С. Предположение об участии лейкокинина было выдвинуто при исследовании асцитной жидкости мышшей-опухоленосителей, у которых введение пепстатина (ингибитора катепсина D) подавляет увеличение асцита.

Заключение

Вполне вероятно, что брадикинины участвуют в воспалительных реакциях, особенно в формировании отека и боли. Однако степень их вклада еще предстоит определить.

II. Кининовые рецепторы и сопряжение рецептор-эффектор

Х. П. РАНГ (H.P. RANG)

Имеются веские доказательства (основанные на фармакологических исследованиях и определении связывания) того, что брадикинин связывается со специфическими мембранными рецепторами и оказывает влияние на клеточном уровне через одну или несколько биохимических передающих систем, которые подобны или даже идентичны системам, участвующим

в действии других гормонов. Рецепторы к БК не выделены и не охарактеризованы биохимически.

Предполагается существование более одного типа БК-рецепторов; некоторые авторы предполагают разделить их на подтипы В1 и В2. Выделение подтипа В1 основывается на данных о том, что дез-арг⁹-БК, неактивный во многих тест-системах, значительно активнее БК в некоторых тканях (в аорте и мезентериальных сосудах кроликов). Более того, лей⁸, дез-арг⁹-БК обладает конкурентным антагонизмом по отношению к БК и дез-арг⁹-БК в тех же тканях, хотя в других тканях подобный антагонизм не наблюдается. Одной из особенностей реакций, опосредованных В1-рецепторами, является то, что они не наблюдаются сразу же после приготовления изолированных препаратов *in vitro*, а усиливаются постепенно в течение нескольких часов в результате процесса, определенно зависящего от синтеза белка [Bonthillier et al., 1987]. Поскольку известно, что БК *in vivo* превращается в дез-арг⁹-БК, В1-рецепторы могут иметь некоторое физиологическое значение. Предполагается, что тканевая травма обуславливает постепенное появление образующихся В1-рецепторов, но имеющиеся сегодня доказательства достаточно скудны и значимость данных рецепторов остается предметом гипотез.

Постулировано, что В2-рецептор-это общее понятие, используемое при описании любой реакции на БК, которая не вызывается дез-арг⁹-БК или блокируется лей⁸, дез-арг⁹-БК. Эти реакции входят в весьма широкий спектр эффектов, вызывающих расширение или сужение многих кровеносных сосудов, сокращение гладких мышц внутренних органов, повышение сосудистой проницаемости, увеличение секреции желудочно-кишечного и дыхательного эпителия, стимуляцию ноцицептивных афферентных нейронов, митогенез и др. Как было показано, эти реакции возникают в результате активации различных передающих систем в разных тканях, поэтому нет оснований предполагать, что во всех случаях участвует один и тот же тип БК-рецепторов. Действительно, недавние исследования с использованием антагонистов (см. ниже) подтвердили возможность существования нескольких разных подтипов В2-рецепторов.

Показано, что у многих типов клеток брадикинин активирует фосфолипазу С, что приводит к образованию инозитолфосфатов и диацилглицерола из мембранных фосфолипидов.

(Детальное описание механизма передачи приведено в главах 2, 3 и 4.) Эти вторичные передатчики вызывают соответственно выделение кальция и активацию протеинкиназы С, а многие эффекты БК, например сокращение гладких мышц, вероятно, являются результатом данного процесса. Кроме того, БК во многих тканях вызывает активацию фосфолипазы А₂, что приводит к образованию арахидоновой кислоты и различных эйкозаноидов (см. главу 10). Многие эффекты БК ослабляются препаратами, подавляющими метаболизм арахидоновой кислоты (см. главы 24 и 25), поэтому предполагается, что двойственность действия БК при активации этих двух жпаз (возможно, опосредуемой одним или несколькими G-белками) необходима для многих его эффектов. Дополнительным механизмом, весьма важным для расширения некоторых (не всех!) сосудов, является выделение РФЭ (см. главу 8). Являются ли рецепторы, связанные с различными системами вторичных мессенджеров, фармакологически различимы, пока неясно.

Интерес к БК-рецепторам в последнее время еще более возрос в связи с получением ряда селективных конкурентных антагонистов, блокирующих многие эффекты, опосредованные В₂-рецепторами. Эти соединения были открыты Stewart и соавт. при многостороннем исследовании эффектов различных аминокислотных заместителей в отношении активности аналогов БК. Модификацией молекулы БК, необходимой для получения антагонистов, является замещение про⁷-ароматической D-аминокислотой, например D-фен (табл. 14). Эта еди-

ничная модификация превращает БК в частичный агонист, эффективность которого зависит от используемой тест-системы. Последующие модификации, показанные в табл. 14, приводят к образованию чистых антагонистов, наиболее сильные из которых имеют рА₂ порядка 6-7. Фармакологические исследования этих антагонистов показали, что они блокируют все эффекты БК без определенного уменьшения реакций на другие пептиды, например на ангиотензин или вещество Р. Блокируются как В₂-, так и В₁-рецепторы. Исследования данных антагонистов в кровеносных сосудах и препаратах гладких мышц внутренних органов обнаружили определенные качественные различия, что, возможно, свидетельствует о некоторой гетерогенности БК-рецепторов, опосредующих разные реакции; однако для получения ясного представления о них необходимы дальнейшие исследования. Следует помнить о чувствительности агонистов и антагонистов БК к инактивации тканевыми пептидазами, что может осложнить определение антагонизма обычными фармакологическими методами. Предполагается, что антагонисты БК должны иметь значительную клиническую ценность, поскольку БК является медиатором ряда реакций при воспалении (особенно возникновения боли, повышения сосудистой проницаемости и увеличения эпителиальной секреции), а также при карциноидном синдроме и демпинг-синдроме. Соединения данного типа, представленные в табл. 14, не имеют клинической значимости, поскольку их пептидная структура предполагает быструю деградацию под действием пептидаз плазменных и тканевых пептидаз и, сле-

Таблица 14. Пептидная структура ряда соединений

Пептид	БК-рецепторы											Характеристика
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
БК	Н	Арг	Про	Про	Гли	Фен	Сер	Про	Фен	Арг	ОН	Агонист (В ₁ и В ₂) Селективный В ₁ -агонист Селективный В-антагонист
[Дез-арг ⁹]-БК	Н	Арг	Про	Про	Гли	Фен	Сер	Про	Фен	ОН		
[Лей ⁸ , дез-арг ⁹]-БК	Н	Арг	Про	Про	Гли	Фен	Сер	Про	Лей	ОН		
[Д-фен ⁷]-БК	Н	Арг	Про	Про	Гли	Фен	Сер	Д-фен	Фен	Арг	ОН	Частичный агонист Неселективные антагонисты
[Тиз ^{5,8} , Д-фен ⁷]-БК	Н	Арг	Про	Про	Гли	Тиз	Сер	Д-фен	Тиз	Арг	ОН	
Д-арг[гип ³ , тиз ^{5,8} , Д-фен ⁷]-БК	Н-Д-арг	Арг	Про	Гип	Гли	Тиз	Сер	Д-фен	Тиз	Арг	ОН	

БК-брадикинин; тиз-тизилаланин; гип-гидроксипролин.

довательно, кратковременность действия. Тем не менее они служат ценным экспериментальным инструментом, который позволяет четко определить роль (или ее отсутствие) БК при различных патологических состояниях.

Дж. Морлей, Дж. М. Хансон, В. М. Румьянек (J. Morley, J. M. Hanson, V. M. Rumjanek)

Иммунная система регулируется сложной сетью клеточных и гуморальных взаимодействий. Неантительные продукты лимфоцитов (лимфокины) и макрофагов (монокины) участвуют во всех фазах иммунного ответа. Лимфокины и монокины являются белками или гликопротеинами, образуемыми лимфоцитами и макрофагами в культуре в ответ на антигенную или митогенную стимуляцию. Они идентифицируются по клеточному происхождению и эффектам, вызываемым в клетках-мишенях. Лимфокины и монокины сами не содержат антигенов или их фрагментов, что отличает их от антител. Термины «лимфокины» и «монокины» не распространяются на низкомолекулярные вещества, выделяемые лимфоцитами и макрофагами при активации (например, про-станойды и нуклеотиды).

Историческая справка

Концепция гиперсенситивности замедленного типа была неопределенной в течение длительного времени, до 1942 г., когда Landsteiner и Chase в классических экспериментах с клеточным переносом показали, что данный процесс связан с лимфоцитами. Гистопатология кожных реакций повышенной чувствительности замедленного типа характеризуется периваскулярным скоплением мононуклеарных клеток вокруг капилляров и небольших венул (особенно в поверхностной дерме), а также нейтрофилов, эозинофилов и базофилов. Эти признаки отличают реакции повышенной чувствительности замедленного типа от ответов на неспецифические повреждения тканей. Ранее предполагалось, что антиген цитотоксичен для сенсibilизированных мононуклеарных клеток при замедленной гиперсенситивности [Rich, Lewis, 1932]. Первое предположение об участии сенсibilизированных лимфоцитов в реакциях повышенной чувствительности замедленного типа было сделано Marks и James в 1953 г. По аналогии с выделением гистамина из тучных клеток после антигенной стимуляции при ана-

филаксии, они предположили, что преформированный медиатор выделяется из лимфоцитов при реакциях повышенной чувствительности замедленного типа. Были предприняты попытки охарактеризовать и последовательно очистить биологически активный материал из разрушенных лимфоцитов, причем особое внимание уделялось кожным реакциям, вызываемым этим материалом, названным фактором проницаемости лимфатических узлов (ФПЛУ). Препараты ФПЛУ были ограничены по спектру биологической активности, и изменения сосудистой проницаемости, видимо, были связаны с основными белками, присутствующими в этом материале.

В то же время внимание ряда иммунологов было направлено на проявления *in vitro* клеточного иммунитета. Хорошо установлено, что селезеночные эксплантаты представляют *in vitro* модель клеточного иммунитета, так как миграция клеток из селезеночного эксплантата подавляется антигенами, вызывающими замедленную гиперсенситивность у животных-доноров. Ввиду трудоемкости и сложности этой методики George и Vaughan предложили капиллярный метод изучения *in vitro* миграции популяций воспалительных клеток, полученных из перитонеальной полости. Как и при использовании метода селезеночных эксплантатов, миграция клеток селективно подавляется антигеном, когда донор клеток проявляет замедленную гиперсенситивность к тому же антигену. Метод капиллярных трубочек позволяет смешивать различные клеточные популяции, поэтому в 1964 г. David и соавт. смогли установить, что для получения реакции требуется лишь небольшой процент клеток от сенсibilизированного донора. Это наблюдение вместе с феноменом подавления антиген-индуцированного торможения клеточной миграции ингибиторами белкового синтеза послужило отправной точкой для предположения о существовании медиатора, обеспечивающего усиление ответа на антиген. В 1966 г. David показал, что антигенная стимуляция вызывает выделение в культуральную среду вещества,

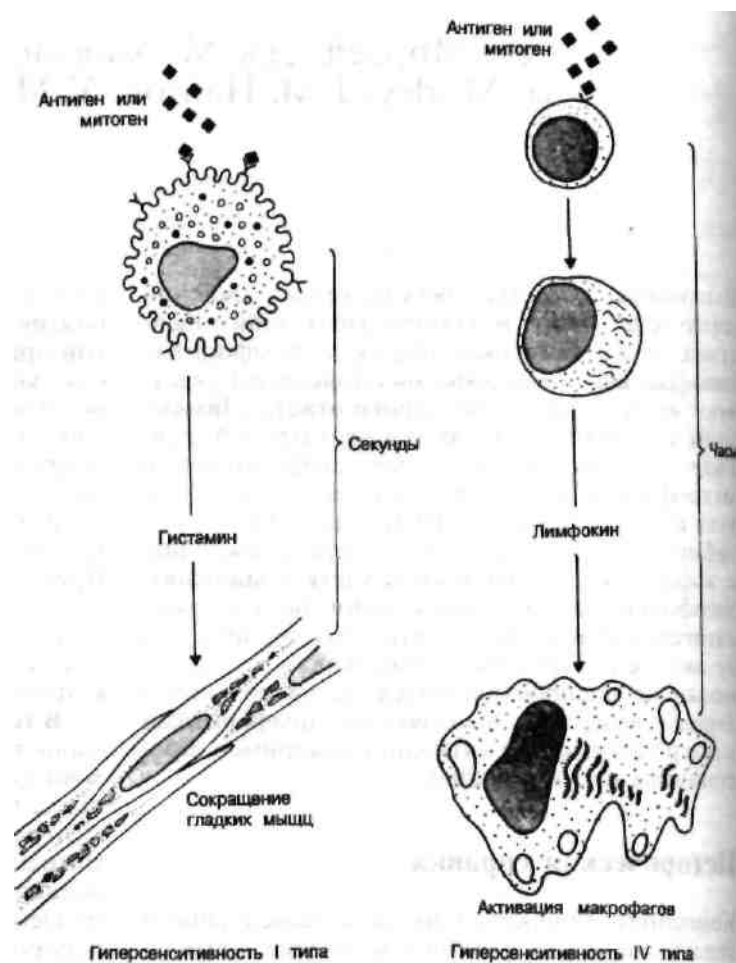


Рис. 64. Концепция лимфокинов: лимфокины представляются такими же иммунологически неспецифическими медиаторами гиперсенситивности IV типа, как и гистамин при гиперсенситивности I типа.

тормозящего миграцию как сенсibilизированных, так и несенсibilизированных клеточных популяций. Vloom и Bennet обнаружили, что макрофаги, преобладающие среди мигрирующих клеток, вызывают торможение миграции. Поскольку на сенсibilизированные лимфоциты, присутствующие вместе с антигеном, приходилась ничтожная часть (<1%), было сделано предположение, что влияние антиген-сенсibilизированных клеток на макрофаги осуществляется через неспецифический фактор. Таким образом, концепция лимфокинов развивалась аналогично концепции дегрануляции тучных клеток, за исключением того, что медиаторы клеточного иммунитета находятся не в преформированном виде, а образуются через несколько часов и обладают более длительными эффектами (рис. 64).

Образование лимфокинов

Лимфокины образуются в процессе активации лимфоцитов. Активация лимфоцитов может быть достигнута специфическим антигеном или (гораздо чаще) неспецифическим (поликлональным) стимулом, например митогеном конканавалином А. Возможно, что и другие неспецифические стимулы активации лимфоцитов вызывают образование лимфокинов. Лимфоидные клетки получают из различных источников, включая селезенку, лимфатические узлы и воспалительные экссудаты, а также периферическую кровь или грудной проток. Кроме того, лимфокиноподобная активность может генерироваться спонтанно лимфоидными клеточными линиями в культуре. Такие лимфоидные клетки, задержанные в G1-фазе клеточного

цикла, продуцируют большее количество лимфокинов, чем клетки, приступившие к митозу. Это совпадает с наблюдением более выраженного синтеза специфического белка (меланин, коллаген, миозин и др.) в неделящихся клетках по сравнению с делящимися. Для получения лимфокинов обычно культивируют примерно 1 млн клеток в 1 мл в течение ночи в присутствии индуцирующего стимула. Выход биологически активного материала чаще всего очень низок, так что в процессе работы приходится заготавливать удачные партии материала для серийных исследований.

Следует отметить, что тщательно контролируемые условия культивирования не обязательно приводят к образованию сравнимых препаратов лимфокинов. Таким образом, относительная активность, а также соотношение различных форм активности в удачных препаратах могут варьироваться в широких пределах.

Методы, используемые для отделения индуцирующего антигена от лимфокинов, зависят от применяемого антигена. При использовании бычьего у-глобулина в качестве антигена добавление в супернатанты культур кристаллического сульфата аммония для получения 40% конечной концентрации приводит к отделению лимфокина от антигена с небольшой потерей биологической активности. Напротив, при колоночной хроматографии и подобных ей методах потеря общей биологической активности бывает значительной. Препараты лимфокинов, полученные посредством лиофилизации, относительно стабильны, однако получаемые таким способом стандартные препараты пока недоступны. Для получения белковых компонентов ряда лимфокинов и монокинов используются скорее методы генной инженерии с клонированием кДНК и ее экспрессией в бактериях. Такие белки обладают биологической активностью, но отличаются от лимфокинов, образуемых активированными клетками, отсутствием в них Сахаров, обычно добавляемых при гликозилировании. Цитокины, полученные таким методом, используются в клинике.

Проявление биологической активности на разных клетках-мишенях

Обычно биологическая активность лимфокинов описывается (по возможности) в контексте с их клетками-мишенями.

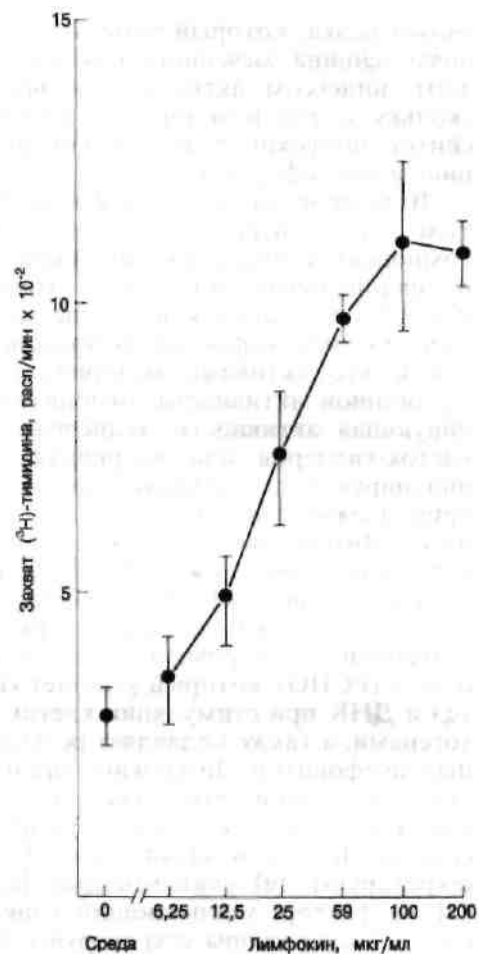


Рис. 65. Кривая доза-эффект стимуляции синтеза ДНК лимфоцитов *in vitro* стандартным препаратом лимфокина. Синтез ДНК определяется здесь по захвату ³H-тимидина (распады в минуту, среднее значение и стандартное отклонение) [Gray и соавт. - Clin. Exp. Immunol., 1976, 23, 333].

Лимфоциты

Первоначальное описание митогенного действия лимфоцитов *in vitro* было дано Kasakura и Lowenstein (1965), отметившими появление митогенного материала в смешанной культуре лимфоцитов, а Dimonde и соавт. в 1968 г. впервые назвали эту наблюдавшуюся активность «лимфокином». Данная стимулирующая активность определялась путем подсчета митозов или по включениям тимидина, меченного тритием, как индекс синтеза ДНК (рис. 65). Активация лимфоцитов может наблюдаться и без их клеточного деления. В этом случае увеличенный

синтез белка, который измеряется по включениям лейцина, меченного тритием, может служить индексом активации лимфоцитов, поскольку с его помощью можно определить синтез лимфокинов, клеточную дифференциацию и пролиферацию.

В течение какого-то времени общепринятым было мнение о том, что митогенный компонент препаратов лимфокинов является поликлональным митогеном. Недавно было показано, что лимфокины представляют собой необходимый кофактор активации лимфоцитов и что активный материал (стимуляция митогенной активности тимоцитов, костимулирующая активность, хелперная активность клеток-киллеров или вторичная активность, индуцирующая цитотоксические Т-клетки) принадлежит одному веществу-интерлейкину-2. Интерлейкин-2 и монокин - интерлейкин-1 (см. главу 15) являются хемотаксическими факторами лимфоцитов. Напротив, супрессорные Т-клетки выделяют ингибиторный лимфокин, растворимый супрессор иммунного ответа (РСИО), который угнетает синтез антител и ДНК при стимуляции клеток Т- и В-митогенами, а также подавляет реакцию смешанных лимфоцитов. Лимфокины принимают участие в регуляции антительного ответа на антиген. Например, детально изучена регуляция синтеза IgE В-лимфоцитами. Т-помощники секретируют IgE-связывающий фактор (IgE-СФ) и фактор, усиливающий гликозилирование, а Т-супрессоры секретируют фактор, подавляющий гликозилирование. Контроль синтеза IgE достигается относительным вкладом этих факторов, так как IgE-СФ стимулирует синтез и секрецию IgE В-лимфоцитами, а гликозилированный IgE-СФ их подавляет.

Макрофаги

Лимфокинами инициируется широкий спектр функций макрофагов, включая подавление миграции, нарушение электрофоретической подвижности, повышение цитотоксичности, хемотаксис и пролиферацию. Лимфокины были впервые описаны при использовании метода подавления миграции макрофагов, а соответствующий биологически активный материал был назван фактором, ингибирующим миграцию (ФИМ). Этот метод интенсивно применяется при исследовании лимфокинов в связи с параллельной чувствительностью к антигену *in vitro* и *in vivo* и широко принят как индикатор клеточного иммунитета *in vitro*. По мере

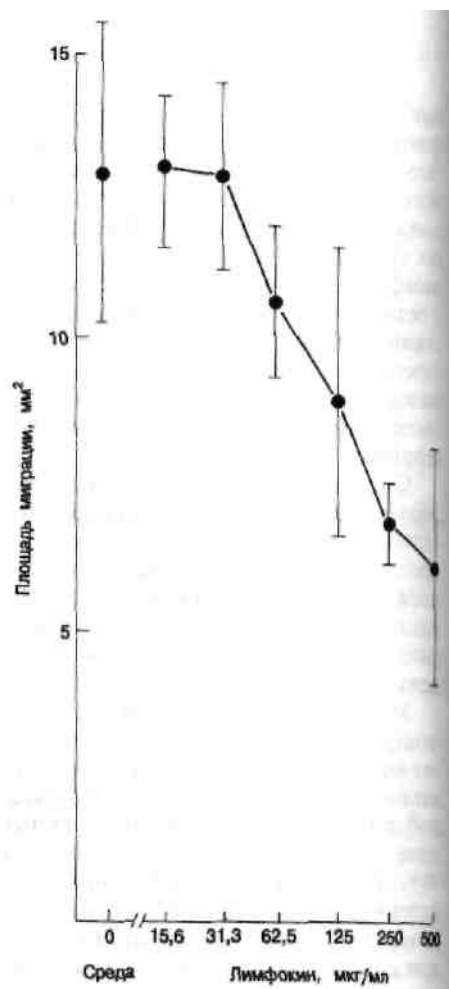


Рис. 66. Кривая доза-эффект подавления миграции макрофагов *in vitro* стандартным препаратом лимфокина (с учетом среднего значения и стандартного отклонения). (По Вгау и др., 1976.)

становления метода ингибирования миграции макрофагов в качестве классического определения активности лимфокинов (рис. 66) выяснялась способность лимфокинов к имитации хорошо известных функций макрофагов, связанных с клеточным иммунитетом, а именно - с активацией макрофагов. Эта активность проявляется усилением движения, фагоцитоза и прилипания к стеклу, а также увеличением бактерицидных и тумороцидных эффектов. Все эти формы активности связаны с другим лимфокином-фактором активации макрофагов (ФАМ). ФАМ представляет первую стадию двухэтапного процесса примирования макрофагов для их стимуляции вторым сигналом,

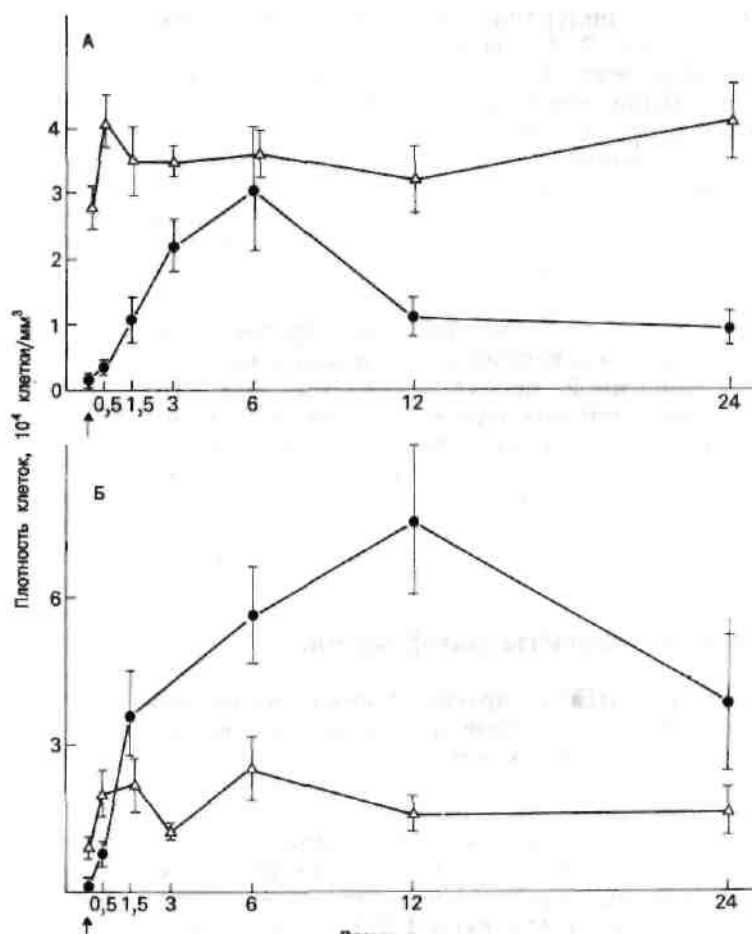


Рис. 67. А-накопление клеток в коже (дерма) после местного введения 100 мкг лимфокина. Точки соответствуют среднему значению (\pm стандартная ошибка) плотности мононуклеарных (треугольники) и нейтрофильных (кружки) клеток в повреждениях, возраст которых указан по оси абсцисс. Значительное накопление клеток наблюдается через 30 мин и 24 ч для мононуклеарных клеток и через 3 и 6 ч-для нейтрофилов. Б-накопление клеток в подкожном слое после местного введения 100 мкг лимфокина. Точки соответствуют среднему значению (\pm стандартная ошибка) плотности мононуклеарных (треугольники) и нейтрофильных (кружки) клеток в повреждениях, возраст которых указан по оси абсцисс. Значительное накопление нейтрофилов наблюдается через 6, 12 и 24 ч [Franco и соавт.- Amer. J. Pathol, 1979, 93, 117].

например липополисахаридом. Исчезновение *in vivo* макрофагов после введения лимфокина может быть обусловлено одним (или более) из этих ферментов *in vitro*.

Гранулоциты

Показано, что препараты лимфокинов вызывают активацию гемопоэтических клеток (колониестимулирующий фактор). Действие лимфокинов на зрелые гранулоциты параллельно их действию на макрофаги и проявляется усилением прилипания к субстрату, образованием кластеров клеток, подавлением их миграции и повышением фагоцитарной активности. Хемотаксическая активность препаратов лимфокинов проявляется по отношению к нейтрофилам, эозинофилам и базофилам, а внутрикожная инъекция лимфокинов вызывает нейтрофильную инфильтрацию (рис. 67).

Остеокласты

Препараты лимфокинов вызывают резорбцию костей. В гистологических образцах тканей после лечения лимфокинами обнаруживается увеличение количества остеокластов. Ввиду этого было сделано предположение, что вызванная лимфокинами резорбция кости связана с активацией остеокластов. Этот процесс не зависит от ПГЕ₂, которые также способен вызывать резорбцию при данной системе определения и, следовательно, может представлять собой непрямым механизм резорбции кости в случае стимуляции воспалительных клеток лимфокинами.

Сосудистый эндотелий

Уже давно известно, что внутрикожные инъекции лимфокинов вызывают воспалительные

реакции с индурацией и эритемой, возникающими через 2-4 ч. Изменения проницаемости, которые лежат в основе отека при таких реакциях, были детально изучены с помощью техники непрерывной регистрации. При этом выделены ранний компонент (мепираминчувствительный) и два поздних компонента. Воспалительная активность классических препаратов лимфокинов относительно низка (рис. 68), однако следует отметить, что они способны повышать проницаемость капилляров, что показано с помощью частиц угля. Эритема, вызванная лимфокинами, отличается от эритемы, обусловленной простагландинами, тем, что она не сопровождается усилением кожного кровотока и проявляется преимущественно расширением капилляров со стазом. С другой стороны, монокины-интерлейкин-1 и фактор некроза опухолей (ФНО- α) являются сильными воспалительными агентами у человека.

Другие эффекты лимфокинов

Определяются и другие формы активности лимфокинов, которые не связаны с конкретным типом клеток-мишеней, а именно: цитотоксичность и антивирусная активность.

Эффекты цитотоксического лимфокина, называемого «лимфотоксином», отличаются от цитотоксических эффектов лимфоцитов тем, что для их максимального проявления требуется 24-48 ч. Монокин ФНО- α цитотоксичен *in vitro* для многих трансформированных клеточных линий; нормальные клетки им не повреждаются. *In vivo* ФНО- α вызывает геморрагические некрозы и деструкцию центральных опухолевых масс саркомы у мышей.

В препаратах лимфокинов присутствует антивирусная активность. Данная активность, продуцируемая активированными лимфоцитами, в настоящее время называется иммунным интерфероном (ИФН- γ) и является лимфокином по определению. Вообще, эффекты, проявляемые иммунным интерфероном в отношении различных клеток, отличаются от эффектов интерферона, индуцированного вирусами. Помимо защиты от вирусов он осуществляет подавление клеточного деления и образования антител, а также усиливает некоторые функции клеток, например активность естественных клеток-киллеров и экспрессию антигенов гистосовместимости на клеточной поверхности. По иммунодепрессивной активности иммунный интерферон в 250 раз пре-

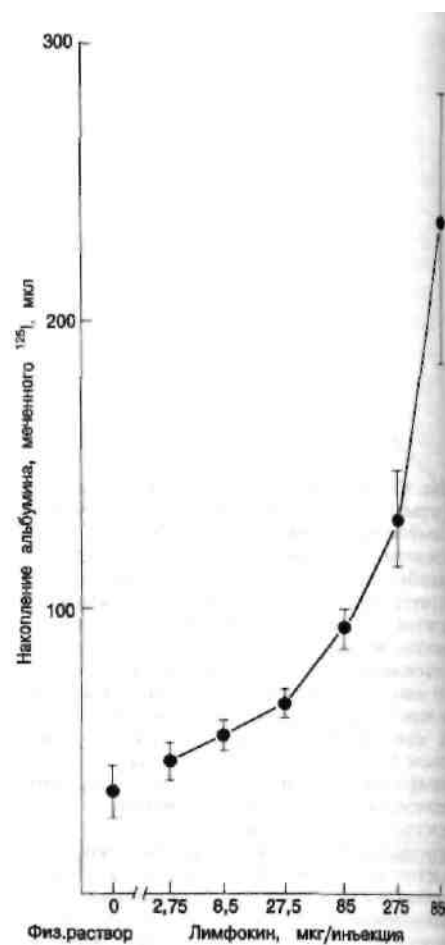


Рис. 68. Кривая доза-эффект, показывающая увеличение сосудистой проницаемости после введения лимфокина (ЛК-1). Накопление белка плазмы регистрируется в мкл эквивалента цельной крови с учетом среднего значения и стандартного отклонения (по Bray и др., 1976).

восходит вирусиндуцированный интерферон (при проведении сравнения на основе противовирусной активности).

Биохимические характеристики

Несмотря на многократные попытки охарактеризовать и очистить лимфокины и монокины, эта задача пока остается недостижимой. Это связано с рядом свойств системы лимфокинов. Лимфокины обычно получают из супернатантов культур, где они содержатся только в малых количествах и в низких концентрациях. Удачные партии лимфокинов обладают

разными формами биологической активности. Кроме того, для образования лимфокинов необходимо применение индуцирующего агента, биохимический профиль которого часто перекрывает биохимический профиль присутствующих в культуральной среде лимфокинов и количество которого может доминировать в субфракциях, содержащих лимфокин. Аналогичные трудности возникают при использовании сывороточных белков, добавляемых в культуру для повышения выхода лимфокинов. Фракционирование препаратов лимфокинов обычно приводит к значительным потерям биологической активности, нивелируя любое увеличение специфической активности. Эти трудности особенно ограничивают очистку небольших партий, поскольку биологические методы определения активности лимфокинов относительно малочувствительны и для их проведения требуется значительное количество материала. Хотя первоначально потеря активности связывалась с нестабильностью препаратов, впоследствии измерение стабильности и успешное применение носителей при фракционировании ФИМ и лимфотоксина показали, что проблема обусловлена неспецифической абсорбцией на поверхности контейнеров, а также материала колонок.

Значительное несоответствие значений молекулярной массы ФИМ в разных лабораториях прямо свидетельствует о критической зависимости точной биохимической природы данной активности лимфокинов от выбранного способа ее получения. В соответствии с этим выводом находится и наблюдение, касающееся зависимости молекулярной массы митогенного фактора (МФ): он имеет молекулярную массу 20 000-25 000 независимо от индуцирующего антигена, но значение изоэлектрической точки (рi) определяется антигеном, используемым при получении лимфокина. Сведения о природе лимфокинов были получены при исследованиях их чувствительности к ферментативному воздействию. В результате было сделано заключение о белковой или гликопротеиновой природе лимфокинов. Часто отмечается гетерогенность препаратов лимфокинов; например, активность ФИМ у морских свинок сочетается с гликопротеиновым 65000 D (рi 3,0-4,5) и протеиновым 25000-43000 D (рi 5,0-5,5) компонентами.

Не исключено, что некоторые формы активности, которые в настоящее время связывают с лимфокинами, в действительности принадлежат низкомолекулярным веществам, ас-

социированным с несущими макромолекулами. Например, ингибитор пролиферации лимфоцитов идентифицирован как полярный гликолипид, соединенный гидрофобными связями с белком-носителем. Чрезвычайно высокая активность фосфолипидных метаболитов и пептидно-липидная природа лейкотриенов C₄ и D₄ свидетельствует в пользу этого предположения. Конечно, высокая активность лейко-триена B₄ (5,12-дигидроксиэйкозатетраеновая кислота) и фактора активации тромбоцитов при хемотаксисе говорит о том, что наличие ничтожного загрязнения может обусловить высокую хемотаксическую активность во многих препаратах лимфокинов. Известно, что очищенный бычий сывороточный альбумин (БСА) содержит связанные жирные кислоты, от которых можно освободиться с помощью специальной обработки. Поскольку ацетилирование препаратов БСА приводит к появлению значительной биологической активности, неотличимой от ФАТ и полностью подавляемой селективными антагонистами ФАТ, не исключено, что такие препараты БСА содержат сорбированный лиз-ФАТ в качестве одной из связанных жирных кислот.

В последние годы получение клеточных линий, синтезирующих лимфокины, а также развитие методов клонирования кДНК и ее экспрессии в бактериях и других клетках привели к значительному прогрессу в изучении лимфокинов. В настоящее время можно получать белки из двух источников и в количествах, достаточных для проведения биохимических анализов, поэтому сейчас выяснилось, что некоторые формы биологической активности, описанной в предыдущем издании этой книги, относятся к ограниченному количеству молекул (табл. 15). В эксперименте с рекомбинантными генами получены биологически активные лимфокины с белковой структурой. Однако природные лимфокины содержат углеводы, которые добавляются к белкам при посттранскрипционном гликозилировании.

Хотя ФИМ, первый из описанных лимфокинов, детально исследован, его очистка, как и клонирование его гена, по-прежнему не достигнута. Предполагается наличие связи между ФИМ и ИФН-у, так как природный и рекомбинантный ИФН-у обладает активностью ФИМ, а моноклональные антитела к ИФН-у нейтрализуют активность ФИМ.

У мышей ИФН-у тесно связан и не может быть отделен от активности ФАМ, хотя у других видов это возможно. В результате экспрес-

Таблица 15. Биохимические характеристики очищенных лимфокинов и монокинов

	Источник	Молекулярная масса		Количество аминокислот
		белок	гликозилированный белок	
Лимфокины				
Интерлейкин-2	Человек	15–19 000	–	153
Интерлейкин-3	Мыши	15 000	28 000, 32 500	166
Гранулоцито-макрофагальный колониестимулирующий фактор	Человек	16 293	22 000	144
γ-Интерферон	Человек	15 500	20 000, 25 000	143
Лимфотоксин	Человек	18 660	25 000	171
РСИО	Мыши	14 000, 21 000	–	–
Монокины				
Интерлейкин-1	Мыши	13–19 000	–	156
ФНО-α	Человек	17 100	–	157

сии к ДНК человеческого ИФН-у в клетке образуется белок (молекулярная масса 18 500 дальтон), содержащий 143 аминокислоты и гликозилированный в природном ИФН-у.

Клонирование и экспрессия ДНК человеческого лимфотоксина (ЛТ) позволяют получить белок (мол. масса 18 600 дальтон), содержащий 171 аминокислоту, который при гликозилировании достигает молекулярной массы природного ЛТ-25 000 дальтон. У ЛТ выявлена 50% гомология с ФНО-α, монокином, выделяемым макрофагами, который также был клонирован и экспрессирован с получением белка с молекулярной массой 17000. Метод рекомбинантных генов использовался для получения интерлейкина-1, а также лимфокинов интерлейкина-2 и интерлейкина-3. Ген ИЛ-1 кодирует 270 аминокислот (предшественник с молекулярной массой 33 000); биологической активностью обладают 156 аминокислот С-конца. Вероятно, предшественник секретируется и затем подвергается процессингу при ферментативном расщеплении до более низкомолекулярных продуктов (15 000–17 000 дальтон). Показано, что протеолиз дает микрогетерогенность, наблюдаемую у ИЛ-1. Ген для интерлейкина-2 кодирует 153 аминокислоты, а выделяемый белок содержит только 133 аминокислоты и имеет молекулярную массу 15 000. Белок ИЛ-2 не гликозилируется, а гетерогенность молекулярной массы достигается с помощью сиалирования. ИЛ-3 (колониестимулирующий фактор), облегчающий самообновление, пролиферацию и развитие стволовых и тучных клеток, гранулоцитов, макрофагов и других клеток, также был клонирован. Выделяемый ИЛ-3 является белком, состоя-

щим из 166 аминокислот (мол. масса 15102), который позже гликозилируется с выходом двух компонентов с молекулярной массой 28 000 и 32 500 дальтон.

Лимфокин РСИО получен не с помощью генного клонирования, а путем очистки супернатанта Т-клеточной гибридомы. При электрофорезе в СДС-полиакриламидном геле выявлено, что РСИО содержит два компонента с молекулярной массой 14000 и 21 000 дальтон. Произведены клонирование и экспрессия человеческого и мышинного гранулоцит/макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Человеческая кДНК для ГМ-КСФ кодирует белок из 144 аминокислот с молекулярной массой 16293. У этого белка выявлена 54% гомология с мышинным ГМ-КСФ, который содержит 130 аминокислот. Человеческий ГМ-КСФ, недавно выделенный из Т-лимфобластной клеточной линии, представляет собой гликозилированный белок с молекулярной массой 22000 (см. главу 22).

Молекулярные характеристики очищенных цитокинов приведены в табл. 15. Вероятно, в будущем станет возможным установление функциональной роли как белкового, так и углеводного компонентов молекулы цитокинов.

Лимфокины как медиаторы воспаления

Совершенно очевидно, что лимфокины могут способствовать повреждению тканей при патологических процессах, облегчая накопление и активацию лимфоцитов, моноцитов, макрофагов и гранулоцитов, а также вызывая гибель

клеток, резорбцию костей, увеличение сосудистой проницаемости и возникновение эритемы. Тканевые повреждения селективно вызываются лимфоцитами, что было показано при переносе клеток у животных или при местном введении лимфоцитов в суставы, пораженные ревматоидным артритом. Показано, что ИЛ-1 (см. главу 15) и ФНО-а стимулируют образование ПГЕ₂ и коллагеназы в синовиальных клетках человека и могут вовлекаться в деструкцию тканей при хроническом воспалении. Эти наблюдения дали лишь приблизительное представление о роли лимфокинов и монокинов в воспалительных реакциях клеток, опосредующих иммунитет; однако следует учесть, что ряд альтернативных объяснений такого рода повреждений тканей в этих условиях достаточно ограничен, так как некоторые характеристики (например, активация лимфоцитов) не достигаются другими медиаторными системами. Окончательные доказательства, основанные на измерении уровня лимфокинов в тканевых жидкостях, ограничены и неопределенны ввиду отсутствия стандартных препаратов лимфокинов или воспроизводимых оценочных процедур. Эти трудности дополняются отсутствием специфических антагонистов, хотя следует отметить, что антитела к неочищенным препаратам лимфокинов способны прерывать реакции повышенной чувствительности замедленного типа. Окончательное соответствие критериев оценки роли лимфокинов как медиаторов воспаления может быть достигнуто и в настоящее время, так как произведена биохимическая очистка некоторых из этих веществ, а также получены моноклональные антитела к некоторым цитокинам. Наблюдается перекрывание различных форм биологической активности некоторых очищенных цитокинов. Действие фактора, активирующего остеокласты, свойственно монокинам (ИЛ-1 и ФНО-а) и лимфокину (лимфотоксин); в то же время ИФН-у подавляет резорбцию костей, которая вызывается этими факторами. Выявлен синергизм взаимодействия ФНО-а, лимфотоксина (называемого также ФНО-Р) и ИФН-у. Супрессорную активность лимфокина РСИО во многих системах связывают с окислением сульфгидрильных групп клеток, а подавление сборки микротрубочек может отменяться интерлейкином-1, интерлейкином-2 и эпидермальным ростовым фактором. Подобное взаимодействие свидетельствует о существовании сети контроля между различными цитокинами.

Центральной проблемой при определении

участия медиатора в воспалительных реакциях является многочисленность медиаторов. Так, наряду с данными, свидетельствующими в пользу участия лимфокинов и монокинов в реакции повышенной чувствительности замедленного типа, существуют сравнительно равноценные доказательства вовлечения других медиаторов, таких, как простагландины, лейкотриены и ФАТ. Первичность лимфоцитов в гиперсенситивности замедленного типа была установлена в экспериментах с переносом клеток, но из этого не обязательно следует, что продукты лимфоцитов, такие, как лимфокины, являются чистыми медиаторами гиперсенситивности замедленного типа. Например, простагландины и тромбоксаны образуются популяциями воспалительных клеток при реакциях клеточного иммунитета; в то же время лимфокины могут вызывать выделение гистамина, депонированного в коже. Известно, что во время клеточных иммунных реакций происходит выделение арахидоновой кислоты. Можно предположить, что здесь же должны присутствовать и продукты окисления арахидоновой кислоты, которые вырабатываются макрофагами в непосредственной близости с активированными лимфоцитами, и что такие вещества могут модифицировать активацию клеток. Интересно, что умеренные концентрации ПГЕ₂ подавляют активацию лимфоцитов и секрецию лимфокинов, а макрофаги, находящиеся в популяциях воспалительных клеток, образуют достаточное количество ПГЕ₂.

Эти наблюдения приводят к предположению, что образование ПГЕ₂ служит физиологическим регулятором секреции лимфокинов (рис. 69). Такая система отрицательной обратной связи служит для регуляции интенсивности и объема реакций клеточного иммунитета. Известно также, что макрофаги образуют достаточное количество тромбоксана А₂ (ТОА₂), а имидазол (ингибитор синтеза тромбоксанов) нарушает активацию лимфоцитов. На этом основании предполагается, что ТОА₂ служит эндогенным стимулятором активации лимфоцитов, причем баланс между ПГЕ₂ и ТОА₂ становится решающим моментом в инициации активационного процесса. Хотя роль метаболизма арахидоновой кислоты в активации лимфоцитов продолжает уточняться, имеется достаточно данных, подтверждающих предположение об их участии в качестве местных гормонов, изменяющих секрецию лимфокинов.

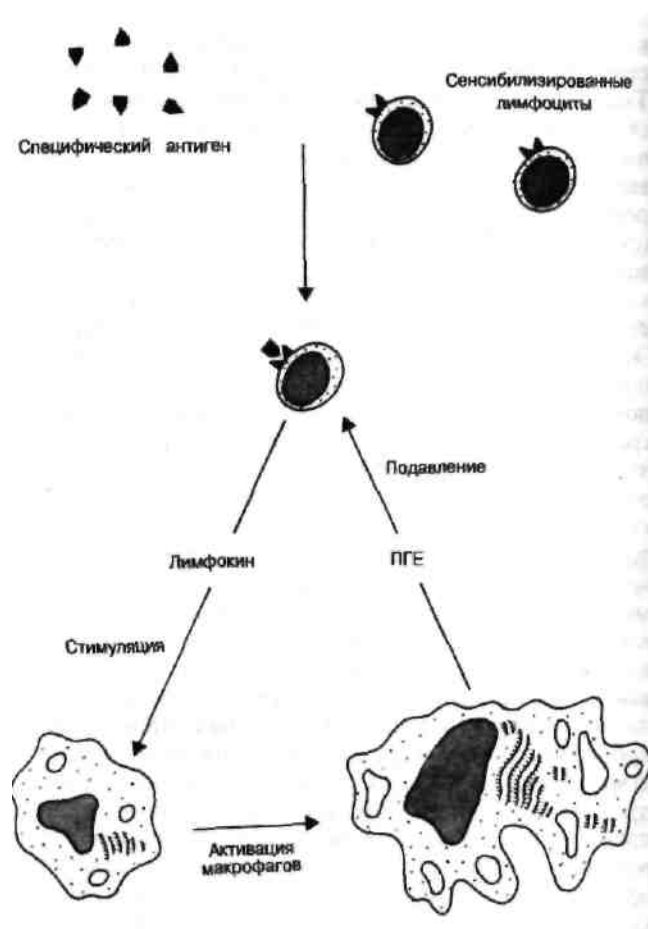


Рис. 69. Система обратной отрицательной связи, в которой простагландины Е (ПГЕ), образуемые активированными макрофагами, ограничивают секрецию лимфокина.

Активация лимфоцитов

Установлено, что в активации лимфоцитов (как и у клеток других типов) участвуют полифосфоинозитиды, внутриклеточный кальций (Ca^{2+}) и циклический аденозин-3',5'-монофосфата (цАМФ). В В- и Т-лимфоцитах после связывания антигена или митогена рецепторами клеточной поверхности в передаче сигнала принимает участие быстрое разрушение фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (ФИФ₂) фосфолипазой С с образованием диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трифосфата (ИФ₃). Диацилглицерол активирует цитозольный фермент- Ca^{2+} /фосфолипидзависимую протеинкиназу С (ПКС), а ИФ₃ вызывает высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматической сети, усиливая тем самым активность ПКС. Эти реакции подавляются цАМФ. Активированная ПКС перемещается из цитозоля на мембрану, чем способствуют лимфокины ИЛ-2 и ИЛ-3. Подобные

изменения вызывают временную клеточную активацию, наблюдаемую при сокращении мышц и секреции желез, которая может подавляться широким спектром препаратов. С другой стороны, лимфоциты нуждаются в продолжительном контакте с активирующим стимулом и относительно резистентны к подавлению лекарственными препаратами в терапевтических концентрациях.

Одним из возможных объяснений является предположение о мембранных изменениях, лежащих в основе поддержания ответа. На мембране активность ПКС еще больше усиливается фосфолипидами, вызывающими фосфорилирование и модификацию мембранных белков, что обуславливает активацию или подавление ферментов, изменение мембранных потенциалов и действие на ионные каналы. Альтернативно предполагается, что присоединение митогена к мембранам вызывает активацию ацил-КоА-лизофосфатидилхолин(КоА-лиз-

ФХ)ацетилтрансферазы. Этот фермент служит для увеличения количества полиненасыщенных жирных кислот (особенно арахидоновой кислоты) в мембранных фосфолипидах, что приводит к изменению физических характеристик мембраны и индуцирует активацию или подавление поверхностных ферментов. Лизофосфатидилхолин, субстрат КоА-лиз-ФХ-ацилтрансферазы, образуется при расщеплении жирных кислот из фосфатидилхолина под действием фосфолипазы A_2 (ФЛА $_2$); данный фермент в лимфоцитах представлен слабо. Вполне вероятно, что источником ФЛА $_2$ являются макрофаги, поскольку этот фермент присутствует в мембранах макрофагов и при активации лимфоцитов происходит тесный контакт между данными типами клеток.

Интерес к регуляции секреции лимфокинов постоянно возрастает ввиду их способности рекрутировать и активировать лимфоциты, что обеспечивает мощную систему положительной обратной связи. Для иммунолога эта система обратной связи весьма привлекательна, поскольку она представляет механизм, с помощью которого организм может реализовать иммунные ответы на различные антигены, когда активно сенсibilизированные клетки составляют ничтожный процент лимфоцитов организма в очаге реакции гиперсенситивности замедленного типа. Столь мощная усиливающая система должна обладать соответствующим

контролем, и недавние исследования взаимодействий монокинов и лимфокинов подтверждают его существование.

Упрощенно процесс трансформации лимфоцитов может быть соотнесен с превращением небольших лимфоцитов в лимфобласты с последующим делением. Такая концепция не учитывает отсутствия какой-либо корреляции между образованием лимфокинов, клеточным делением и другими формами активации лимфоцитов, в которых не участвует синтез ДНК, такими, как дифференциация во вторичные цитотоксические Т-клетки. Активированные клетки образуют кластеры, в которых лимфоциты и макрофаги тесно контактируют, что свидетельствует о необходимости двух типов клеток для активации лимфоцитов. Активация проходит определенные дискретные стадии, каждая из которых требует собственного сигнала для прохождения. Так, активация инициируется после взаимодействия с митогеном (или, возможно, с антигеном), а через 4-6 ч эти клетки становятся восприимчивыми ко второму сигналу, при отсутствии которого трансформация прекращается. Поступление сигнала обеспечивается митогенным лимфокином (интерлейкином-2), так что этот лимфокин может рассматриваться как вспомогательный фактор, облегчающий активацию лимфоцитов (рис. 70). Возможно, что клетками, отвечающими за образование этого лимфокина, являются лим-

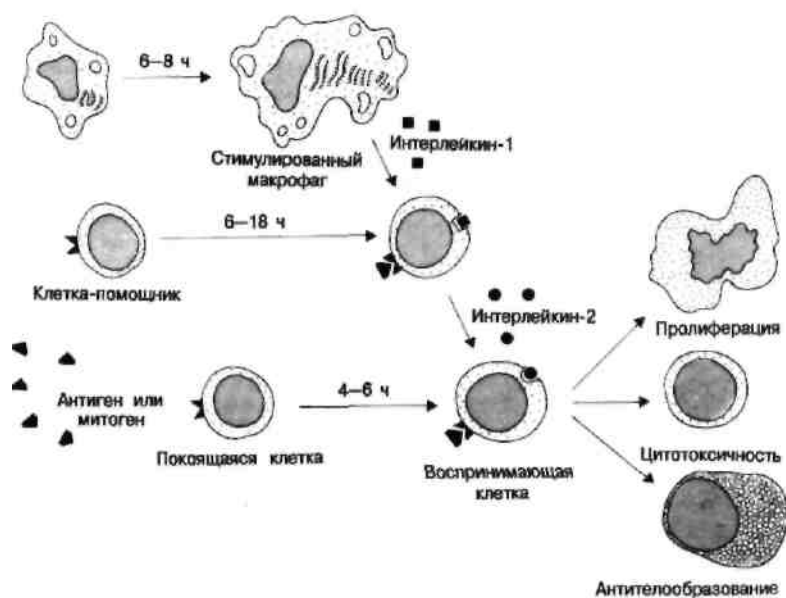


Рис. 70. Регуляция интерлейкинами активации лимфоцитов.

фоциты-помощники. В свою очередь образование интерлейкина-2 может быть достигнуто только в том случае, если активация клеток, секретирующих лимфокин, происходит в присутствии другой регуляторной молекулы - монокина интерлейкина-1, продукта активации макрофагов. Отрицательный контроль может осуществляться лимфокином (РСИО), который, как полагают, образуется супрессорными Т-клетками и подавляет вызванную ИЛ-1 и ИЛ-2 активацию лимфоцитов. *In vitro* подавление активации достигается также посредством простагландинов типа Е, которые вырабатываются макрофагами при их стимуляции ИФН-у или фибробластами и синовиальными клетками, стимулированными ФНО-а. Очевидно, что существует не один механизм отмены активации лимфоцитов для выполнения эффекторных функций; такой многосторонний контроль предположительно защищает от неадекватной активации лимфоцитов. Ясно, что дефект системы контроля должен иметь серьезные неблагоприятные последствия и может вносить свой вклад в постоянную активацию, наблюдаемую при многих формах хронического воспаления.

15 Интерлейкин-1

К. А. Динарелло (C. A. Dinarello)

Интерлейкин-1 представляет собой семейство полипептидов с молекулярной массой 17 500, которые продуцируются различными клетками в ответ на инфекцию, травму, токсины или иммунные реакции. В настоящее время две его формы клонированы из макрофагов и известна и полная аминокислотная последовательность. Для их описания используются термины «ИЛ-1-а» и «ИЛ-1-р». Хотя обе формы ИЛ-1 обладают только 26% аминокислотной гомологией, у них отмечается одинаковый спектр биологической активности. Например, обе формы индуцируют продукцию ИЛ-2 в Т-клетках (см. главу 1), вызывают лихорадку (см. главу 19) и увеличивают синтез ПГЕ₂ (см. главу 10), коллагена и коллагеназы. В общем виде ИЛ-1 опосредует множество эффектов, связанных с защитой организма от инфекции, с локальной реакцией на травму и последующими процессами восстановления. Тем не менее одним из остающихся без ответа вопросов является вопрос о том, как единичная молекула может обладать столь разнообразными биологическими возможностями. Молекулярное клонирование ИЛ-1 с применением технологии рекомбинантной ДНК дало возможность получать большие количества ИЛ-1. Используя рекомбинантные ИЛ-1, исследователи подтвердили, что данное вещество реально обладает широким спектром биологической активности.

Формы ИЛ-1 (табл. 16)

ИЛ-1 сначала синтезируется в виде молекулы предшественника с молекулярной массой около 31000. Как ИЛ-1-а, так и ИЛ-1-В формируют полипептидную цепь, не имеющую сигнальной пептидной группы, характерной для большинства секретируемых белков и функционирующей как место расщепления крупного предшественника на более мелкие «зрелые» белки, которые затем секретируются. Причина отсутствия сигнального пептида в ИЛ-1 пока неизвестна; предлагаются следующие объясне-

ния: а) эта молекула предназначена скорее для внутриклеточного существования, нежели для транспорта в экстрацеллюлярное пространство; б) отсутствие сигнального пептида указывает на существование древней и примитивной молекулы, возникшей до появления компетентной системы циркуляции; в) внутриклеточный ИЛ-1 высвобождается только при гибели клеток. Получены данные, свидетельствующие в пользу всех трех гипотез. Например, некоторые исследователи показали, что при стимуляции большая часть вновь синтезируемого ИЛ-1 остается внутри клетки; более того, ИЛ-1 часто бывает связанным с внешней клеточной мембраной. Кроме того, количество ИЛ-1, выделяемого во внеклеточную среду, является функцией клеточных пертурбаций или гибели, в том смысле, что более сильные стимуляторы, такие как фагоцитированные частицы, приводят к лизису клеток и выделению большого количества внеклеточного ИЛ-1. Наконец, в подтверждение эволюционного значения ИЛ-1 показано, что молекулы, подобные ИЛ-1 и выделенные из фагоцитов морской звезды, активны и в отношении клеток человека.

ИЛ-1-а является кислым пептидом, обнаруживаемым главным образом в клетках мышей и лишь в небольших количествах в клет-

Таблица 16. Формы интерлейкина-1

Источник	Форма	Предшественник ^а	Уровень иРНК
Моноциты крови человека	7-β	269 (117) ^б	1–5%
Моноциты крови человека	5-α	271 (113)	0,01–0,1%
Макрофаги мышей (P388D)	5-α	270 (115)	0,005% ^а
Макрофаги (легочные) кроликов	5-α	267 (113)	?

^а Количество аминокислот в предшественнике ИЛ-1.
^б Количество N-терминальных аминокислот в зрелой форме

ках человека. ИЛ-1-В относится к нейтральным пептидам и представляет собой основной продукт клеток человека, особенно моноцитов и макрофагов. У обеих форм выявлено лишь 26% аминокислотной гомологии, но на С-конце гомология гораздо выше. Ввиду этого обстоятельство было выдвинуто предположение о функции аминокислот углеродного конца как «активного центра» ИЛ-1. В пользу концепции существования активного центра ИЛ-1 на пептиде с молекулярной массой 4000-5000 дальтон приводятся следующие аргументы: а) проявления биологической активности ИЛ-1 одинаково не зависят от различия двух его форм; б) малые фрагменты молекулы ИЛ-1 с массой 4000 дальтон выделены из плазмы, мочи, синовиальной и перитонеальной жидкостей (у человека); в) эти пептиды проявляют различную биологическую активность, например вызывают лихорадку, индуцируют образование ИЛ-2 и стимулируют пролиферацию фибро-бластов. Таким образом, ИЛ-1 в отличие от других лимфокинов и монокинов подвергается ограниченному протеолизу с образованием пептида (молекулярная масса 4000 дальтон), который в отношении аминокислотной последовательности может представлять как ИЛ-1-а, так и ИЛ-1В. Это и неудивительно: ведь ИЛ-1 образуется клетками в среде, богатой протеазами, например, в поврежденных тканях, где происходит его расщепление.

Биологическая активность ИЛ-1

Многогранная биологическая активность ИЛ-1 (табл. 17) свидетельствует о том, что этот полипептид опосредует как некоторые виды системного ответа острой фазы, так и местные изменения воспалительных и иммунных реакций. Системные симптоматические эффекты ИЛ-1 включают возникновение лихорадки (см. главу 19), повышенной сонливости, генерализованных миалгий и головной боли. Лабораторные анализы крови обнаруживают систем-

Таблица 17. Биологическая активность ИЛ-1

Вызывает лихорадку	Вызывает
нейтрофилию	Стимулирует
эндотелиальные клетки	Индукцирует синтез
ПГЕ ₂ , ПГ2, ТОВ ₂	Повышает продукцию
коллагеназы	Вызывает резорбцию костей
Стимулирует синтез белка острой фазы	

ные изменения, вызываемые ИЛ-1 и характерные для острой фазы, в том числе нейтрофилию с циркуляцией незрелых форм (см. главу 20), пониженное содержание цинка и железа, а также гипоальбуминемия и повышение уровня некоторых печеночных реактантов острой фазы. К последним относятся сывороточные амилоидные белки А, депонирующиеся в тканях в виде амилоидных нитей. С-реактивный белок является уникальным протеином острой фазы, который структурно соотносится с амилоидным протеином. Во время острой фазы реакции в крови повышается уровень фибриногена, гаптоглобина, некоторых компонентов комплемента и антипротеазы. Увеличение сывороточного содержания этих печеночных белков и α -глобулинов способствует повышению скорости оседания эритроцитов, которая часто используется как лабораторный индикатор патологических процессов.

Локальные эффекты ИЛ-1 наиболее выражены в полостях суставов, в коже и брюшной полости, однако местно образованный ИЛ-1 вносит свой вклад в различные патологические процессы в любой ткани. ИЛ-1 участвует в разрушении тканей и усилении воспалительной реакции; в то же время ряд его биологических эффектов направлен на процессы репарации. Например, ИЛ-1 вызывает образование ПГЕ₂ и коллагеназы, а также может быть хемоаттрактантом лейкоцитов (см. главу 3). Кроме того, он увеличивает дегрануляцию. Действие ИЛ-1 на эндотелиальные клетки гораздо драматичнее. ИЛ-1 вызывает адгезию лейкоцитов, повышает прокоагулянтную активность поверхностей, способствует выделению фактора активации тромбоцитов и ослабляет действие активатора плазминогена (см. главу 8). Последний эффект опосредуется индукцией ИЛ-1 тканевого ингибитора активации плазминогена. Биологическое действие ИЛ-1 на эндотелиальные клетки в совокупности представляет собой хорошо скоординированные усилия по локализации и обезвреживанию инфекции и повреждений.

Восстановительные процессы, вызываемые ИЛ-1, связаны главным образом с его способностью усиливать экспрессию генов некоторых типов коллагена. Кроме того, ИЛ-1 фиксирует макрофаги и нейтрофилы, участвующие в процессах очищения, и удаляет остатки омертвевших и разрушенных тканей. ИЛ-1 принимает участие в опосредованной остеокластами резорбции кости, что имеет важное значение при образовании новых костных тканей. В то же

время постоянная продукция ИЛ-1 в суставах и других замкнутых полостях, вероятно, усиливает процессы фиброза и склерозирования. Наглядным примером последнего может служить образование утолщений синовиальных и перитонеальных поверхностей и спаек у больных перитонитом, а также формирование паннуса при ревматоидном артрите. По-видимому, в течение какого-то времени после травмы или инфекции функции ИЛ-1 в целом направлены на усиление попыток организма локализовать и разрешить тканевые повреждения, однако персистенция заболевания приводит к хронической продукции местного ИЛ-1, что впоследствии обуславливает возникновение нежелательных патологических процессов, сопровождающихся деструкцией и нарушением функций.

Одним из важных компонентов биологической активности ИЛ-1 является его способность усиливать Т- и В-клеточные ответы (см. главы 1 и 7). Эта активность ИЛ-1 в целом характеризуется как «лимфоцитактивирующий эффект». Действительно, раньше ИЛ-1 был известен как «лимфоцитактивирующий фактор». В присутствии антигенов (или митогенов) ИЛ-1 способствует переводу Т- и В-клеток в состояние повышенной функции; сам же ИЛ-1 не стимулирует лимфоциты. При инкубации Т-клеток с ИЛ-1 и митогеном начинается образование ИЛ-2 и усиливается экспрессия рецепторов для ИЛ-2. Действие ИЛ-1 на Т- и В-клетки в присутствии антигена ограничивается начальными стадиями активации лимфоцитов; предполагается, что ИЛ-1 действует как разрешающий агент, эндогенный адьювант или усиливающий фактор. Вопрос об абсолютной необходимости ИЛ-1 для активации лимфоцитов остается нерешенным. Противоположные версии основываются на факте отсутствия изменений в интенсивности реакции *in vitro* после добавления ИЛ-1; более того, активация лимфоцитов может проходить и без определяемого в культуральной жидкости ИЛ-1. Однако, как показывают недавние исследования, ИЛ-1 часто прикрепляется к плазматической мембране и осуществляет свою функцию без секреции. Это последнее наблюдение также соответствует предположению, что некоторые клетки не процессируют полипептидный предшественник ИЛ-1 и не выделяют его во внеклеточное пространство, в результате чего ИЛ-1 остается связанным с клеткой. Данная концепция получила дальнейшее подтверждение в том, что В-клетки могут вы-

полнять антигенпредставляющую функцию и содержат ИЛ-1, ассоциированный с мембраной.

Образование и ингибирование ИЛ-1 (табл. 18 и 19)

Циркулирующие моноциты крови не содержат иРНК, кодирующих ИЛ-1. Однако через несколько минут после прикрепления к покрытой сывороткой поверхности (стеклянной или пластиковой) могут наблюдаться транскрипция ИЛ-1 и синтез его белкового предшественника (см. главу 6). В присутствии веществ, индуцирующих ИЛ-1, таких как эндотоксин, комплекс антиген-антитело, пептид комплемента C5a (см. главу 12) и многих других, транскрипция и трансляция ИЛ-1 возрастают в несколько раз. Более того, выделение ИЛ-1 во внеклеточную среду увеличивается в сотни раз. Таким образом, выработка макрофагами ИЛ-1 является двухступенчатым процессом: а) транскрипция и трансляция полипептидного предшественника протекают на среднем уровне без значительного накопления ИЛ-1 вне клетки; б) в присутствии ИЛ-1-индуцирующих

Таблица 18. Некоторые активаторы продукции ИЛ-1

Вирусы, бактерии, спирохеты, дрожжи
Эндотоксины (липополисахариды)
Грампозитивные экзотоксины (токсин синдрома токсического шока, энтеротоксины, эритрогенные токсины) Соли желчи, этиоханоолон, андрогенные стероиды Фактор некроза опухолей, лимфотоксин, лимфокины
Колонистимулирующие факторы Комплексы антиген - антитело C5a, кремний, гликоцеребозид Тромбин

Таблица 19. Влияние препаратов на продукцию или активность ИЛ-1

Продукция ИЛ-1

Кортикостероиды - уменьшают Ингибиторы липоксигеназы- уменьшают Соединения золота- уменьшают Ингибиторы циклооксигеназы- увеличивают Циклоспорин-не изменяет

Активность ИЛ-1

Кортикостероиды - снижают Ингибиторы липоксигеназы-снижают Циклоспорин- снижает Ингибиторы циклооксигеназы-повышают, снижают или не изменяют

веществ повышается синтез ИЛ-1 и ускоряется выделение ИЛ-1 с молекулярной массой 17 500 дальтон во внеклеточные отсеки. Остается непонятным, каким образом вещества, индуцирующие ИЛ-1, стимулируют не только стадии, связанные с транскрипцией и трансляцией, но и (что более важно) активируют клеточные механизмы, обуславливающие его расщепление и выделение. Однако, исходя из оценки этих стадий, можно определить механизм, посредством которого различают противовоспалительные препараты уменьшают продукцию ИЛ-1.

Ацетилсалициловая кислота, индометацин, ибупрофен и другие ингибиторы циклооксигеназы (см. главу 25) не подавляют синтез и выделение ИЛ-1. Напротив, перечисленные препараты увеличивают его образование *in vitro*. Это может быть связано с тем, что большинство (если не все) веществ, индуцирующих ИЛ-1, повышает и концентрацию ПГЕ₂, который подавляет продукцию ИЛ-1. Так, в присутствии ингибиторов циклооксигеназы образование ИЛ-1 протекает без супрессивного влияния простагландинов. По-видимому, простагландины подавляют образование ИЛ-1 на уровне транскрипции. Если ПГЕ₂ подавляет продукцию ИЛ-1, то лейкотриены, особенно ЛТВ₄, ее увеличивают. Поэтому не является неожиданностью тот факт, что препараты, нарушающие липоксигенацию арахидоновой кислоты в лейкотриены, уменьшают образование ИЛ-1. С помощью этого механизма препараты типа BW755C снижают образование ИЛ-1 в случае их присутствия во время начальной стадии адгезии или перед добавлением веществ, индуцирующих продукцию ИЛ-1.

Механизм усиления образования ИЛ-1 под действием ЛТВ₄ пока неизвестен; однако другие мощные ингибиторы ИЛ-1, препараты группы кортикостероидов, по-видимому, способны предотвращать транскрипцию ИЛ-1. Это понятно, поскольку кортикостероиды оказывают влияние на выделение арахидоновой кислоты, в результате чего происходит уменьшение липоксигенации и образования лейкотриенов. Недавние исследования показали, что соединения золота также блокируют продукцию ИЛ-1 посредством предупреждения синтеза лейкотриенов. Циклоспорин не нарушает образования ИЛ-1.

Одним из механизмов изменения воспалительных и иммунных реакций, опосредованных ИЛ-1, является снижение продукции медиатора. Другой механизм связан с ослаблением

действия ИЛ-1 на различные клетки-мишени. Многие эффекты ИЛ-1 опосредуются продуктами циклооксигеназы-ПГЕ₂, ПГ₂, и ТО (см. главу 10). Например, ИЛ-1 индуцирует ПГЕ₂ в гипоталамусе, фибробластах, эндотелиальных и синовиальных клетках, мышцах и хондроцитах. Вследствие этого ингибитор циклооксигеназы уменьшает лихорадку, в суставах и генерализованные миалгии. С другой стороны, действие ИЛ-1 на лимфоциты подавляется ингибиторами циклооксигеназы. Из препаратов, блокирующих действие ИЛ на лимфоциты, в клинике обычно применяют только кортикостероиды. Однако свойств кортикостероидов как иммунодепрессантов не ограничиваются их влиянием на опосредованную ИЛ-1 активацию Т-лимфоцитов и связан с их действием на ИЛ-2. Такие препараты, как BW755C, блокирующие обмен 5-липоксигеназы, способны уменьшить ИЛ-1-опосредованную активацию Т-клеток, но они также могут нарушить пролиферацию Т-клеток, регулирующую ИЛ-2. Циклоспорин, блокирующий действие ИЛ-2 на Т-клетки, подавляет и образование ИЛ-2, опосредованное ИЛ-1.

Клеточные источники ИЛ-1 (табл. 20)

Первыми из хорошо изученных клеток, продуцирующих ИЛ-1, являются моноциты-макрофаги (см. главу 6). Такие клетки располагаются на ряде стратегических направлений в организме, где внедрившиеся микроорганизмы быстро фагоцитируются и разрушаются (например, альвеолярные макрофаги в легких). Кроме того, главные органы, фильтрующие кровь, - печень и селезенка - выстланы купферовыми клетками и селезеночными макрофагальными клетками. Макрофаги обнаруживаются также в головном мозге (олигодендроглия), lamina propria и лимфатических узлах; они рассеяны практически во всех тканях в виде тканевых макрофагов. Однако некоторые специализированные клетки, также способные к продуциро-

Таблица 20. Клеточные источники ИЛ-1

Моноциты, макрофаги, клетки Купфера, синовиальные клетки
Кератиноциты, клетки Лангерганса, эпителиальные клетки
В-клетки, большие гранулярные лимфоциты (ЕК-клетки)
Астроциты, олигодендроглия, микроглия
Мезангиальные клетки, эндотелиальные клетки

ванию ИЛ-1, вероятно, играют важную роль при патологических повреждениях ряда тканей и органов. Кератиноциты кожи являются первыми немаркочаевыми клетками, в которых было показано образование ИЛ-1. Затем продукция ИЛ-1 последовательно обнаруживалась в мезангиальных клетках почек, эпителиальных клетках роговицы и десен, В-клетках, больших гранулярных лимфоцитах (известных как клетки-киллеры), клетках Лангерганса и астроцитах мозга. Совсем недавно эндотелиальные клетки также были идентифицированы как продуценты ИЛ-1 (см. главу 8). Эндотелиальные клетки выделяют ИЛ-1-В при стимуляции эндотоксином. Образование ИЛ-1 эндотелиальными клетками может играть важную роль в локализации инфекции и воспалительных очагов. В таких ситуациях ИЛ-1 скорее действует как аутокринный регулятор, нежели как гормон. ИЛ-1 активирует адгезивность эндотелиальных клеток для нейтрофилов, лим-

фоцитов и моноцитов, а также повышает прокоагулянтную активность. Кроме того, ИЛ-1 стимулирует образование эндотелиальными клетками фактора, активирующего тромбоциты, и ингибитора активатора плазминогена. Вызванные ИЛ-1 изменения эндотелиальных клеток обуславливают формирование сгустка и аккумуляцию лейкоцитов, что может служить целям ограничения инфекции и травмы.

16 Фактор активации тромбоцитов

Дж. Морлей (J. Morley)

У многих видов млекопитающих значительное количество биогенных аминов, таких как гистамин или серотонин, хранится в секреторных гранулах тканевых тучных клеток и циркулирующих базофильных лейкоцитов. Хорошо изучен процесс взаимодействия аллергена и IgE на поверхности таких клеток, который приводит к секреции этих аминов (см. главу 2), в настоящее время широко распространено мнение о том, что секреция медиатора в подобных клетках значительно способствует гиперсенситивности I типа и клиническим проявлениям аллергии.

У кроликов такой механизм отсутствует, так как гистамин крови у них почти полностью хранится в тромбоцитах. Как и у других видов, у кроликов аллергическая реакция включает в себя активацию базофилов. Возможно, активированные лейкоциты вызывают высвобождение гистамина непрямым способом, а именно через секрецию фактора, действующего на тромбоциты. Выделение такого вещества, агрегирующего тромбоциты, можно обнаружить, используя базофилы, активированные IgE. В 1972 г. Benveniste, Henson и Cochrane назвали этот биологически активный материал фактором активации тромбоцитов (ФАТ).

Значительный прогресс в определении биологической активности данного вещества является прямым следствием тех быстрых темпов, с которыми ФАТ был химически охарактеризован и синтезирован. Синтетический ФАТ был получен в 1981 г.; с тех пор его фармако-

логические эффекты были изучены на большом спектре тестовых систем.

Липидная природа ФАТ предполагалась основании растворимости биологически активного материала в органических растворителях. На основании чувствительности к ферменту и имеющимся хроматографическим характеристикам ФАТ предположительно относят к лифосфолипидам. К 1979 г. были получены четкие доказательства того, что ФАТ представляет собой ацетилглицериновый эфир фосфохолина (АГЭФХ). Соответственно предполагается, что данная химическая структура лежит в основе активности антигипертензивного липидного вещества мозга (АПЛП), которая определяется по вазодепрессивному эффекту. Последующие попытки выделить наличие АГЭФХ в очищенных препаратах ФАТ, образованного при IgE-зависимой активации кроличьих базофилов, позволили обнаружить две формы с этильными остатками (С18 и С16), причем обе формы являются сильными стимулами активации тромбоцитов (рис. 71). Синтез ФАТ осуществлен Godfn в 1980 г.; в настоящее время обе его формы коммерчески доступны.

Номенклатура

Номенклатура биологически активных веществ часто весьма причудлива и не подчиняется какой-либо принятой системе правил. В настоящее время стало очевидным, что АПЛП

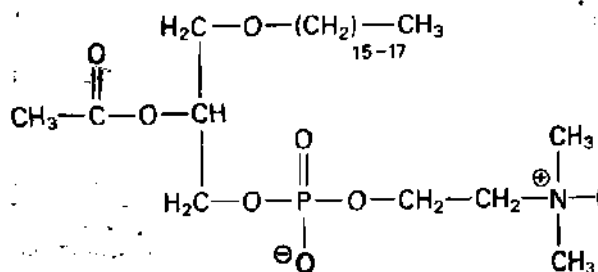


Рис. 71. 1-0-гексадецил/октадецил-2-ацетил-sn-глицерил-3-фосфорилхолин (АГЭФХ).

отличается от ФАТ; с трудом отличаются от него и некоторые формы медленно действующего вещества (МДВ). Вряд ли поиск исторического прецедента мог бы принести большой успех. Равным образом нецелесообразна ревизия номенклатуры посредством введения наименований с фонетическими характеристиками (АГЭФХ, ФАТ-ацетозфир), поскольку это лишь затруднит их использование в научных дискуссиях.

Популярное применение обозначения ФАТ как основного термина аналогично использованию названия кинины.

Образование

ФАТ образуется в клетках самых разных типов из фосфолипидов-предшественников, которые являются составной частью клеточных мембран.

При воспалительных и аллергических реакциях ФАТ образуется таким путем, при кото-

ром алкилацилглицерофосфохолины превращаются в ФАТ через промежуточные лизо-соединения при совместном действии фосфолипазы A_2 и ацетил-КоА: 1-алкил-2-лизо-3-глицеро-3-фосфорилхолинацетилтрансферазой. Этот общий цикл может представлять собой челнок для переноса арахидоната между этерифицированными липидами (рис. 72); следовательно, формирование ФАТ происходит одновременно с образованием арахидоновой кислоты и соответственно продуктами ее окисления-простагландинами, тромбоксаном A_2 и лейкотриенами (см. главу 10).

Существуют два пути образования ФАТ. Так, синтез de novo из 1-алкил-2-лизин-8п-глицеро-3-фосфата достигается апетилированием, дефосфорилированием и переносом фосфорилхолина (рис. 73). Этот путь de novo отличается от пути реутилизации, в котором участвует фосфолипаза A_2 . При образовании ФАТ воспалительными клетками путь de novo не используется.

Понимание существования двух различных

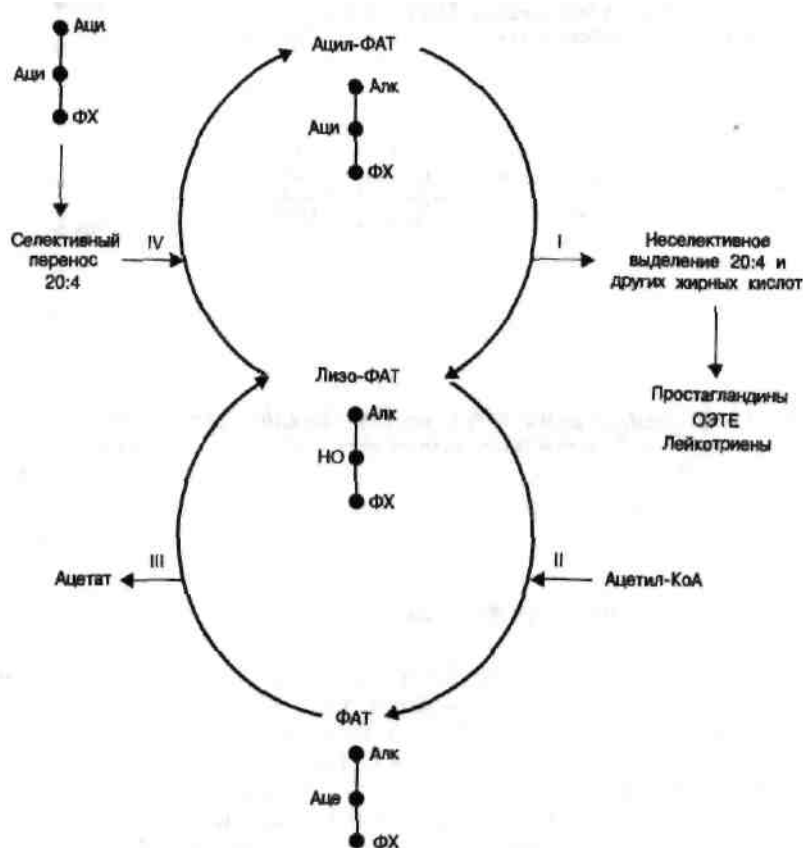


Рис. 72. Цикл ФАТ, челночный последовательный перенос арахидоната и ацетата по эфирам липидов.

Римскими цифрами обозначены ферменты, катализирующие реакции данного цикла: I - фосфолипаза A_2 ; II - ацетил-КоА: 1-алкил-2-лизо-3-глицеро-3-фосфохолин-ацетилтрансфераза; III - 1-алкил-2-ацетил-3-глицеро-3-фосфохолин-ацетилгидролаза; IV - фосфатидилхолин: 1-алкил-2-лизо-3-глицеро-3-фосфохолин-арахидоноилтрансфераза. Аци-ацил; алк-алкил; ФХ-фосфорилхолин; аце-ацетил.

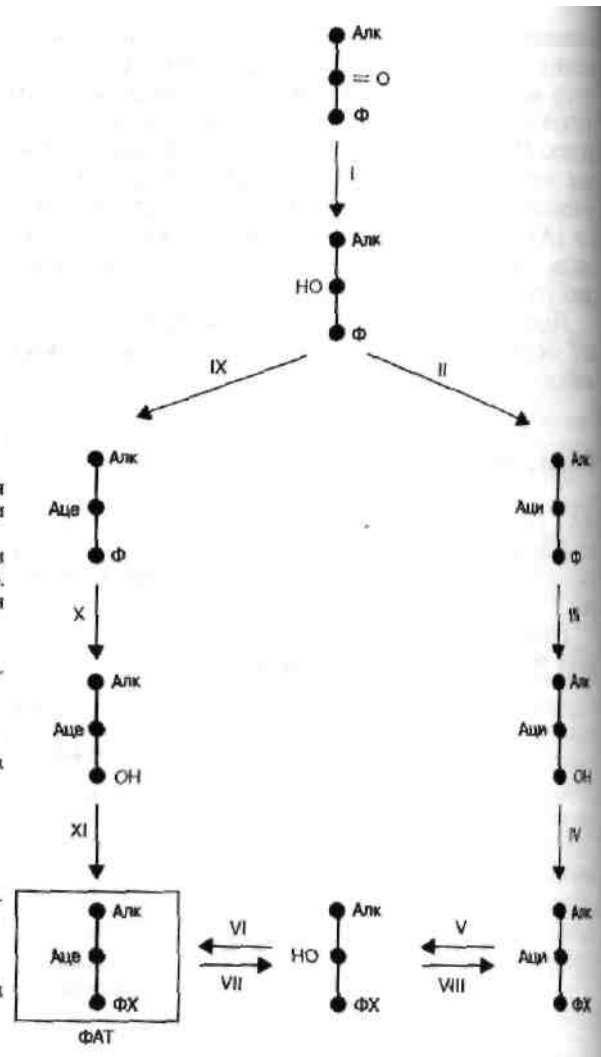


Рис. 73. Два пути биосинтеза ФАТ.

Путь *de novo*, представляющийся физиологическим для синтеза ФАТ как медиатора, включает в себя реакции IX, X и XI. Путь восстановления («цикл ФАТ») биосинтеза ФАТ предположительно является основным путем при воспалительных реакциях (реакции V и VI). Специфические этапы реакции обозначены римскими цифрами. Они катализируются следующими ферментами: I – НАДФ: алкилгидроксиацетон-Ф-оксидоредуктаза (ЕС 1.1.1.100); II – ацил-КоА: 1-алкил-2-лизо-*sn*-глицеро-3-Ф-ацилтрансфераза (ЕС 2.3.1.63); III – 1-алкил-2-ацил-*sn*-глицеро-Ф-фосфогидролаза; IV – 1-алкил-2-ацил-*sn*-глицерол: ЦДФ-холин-холинфосфотрансфераза (ЕС 2.7.8.2); V – фосфолипаза A_2 ; VI – ацетил-КоА: 1-алкил-2-лизо-*sn*-глицеро-3-фосфохолин-ацетилтрансфераза (ЕС 2.3.1.67); VII – 1-алкил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин-ацетилгидролаза (ЕС 3.1.1.48); VIII – донорский фосфолипид (20:4): 1-алкил-2-лизо-*sn*-глицеро-3-фосфохолин-трансацилаза; IX – ацетил-КоА: 1-алкил-2-лизо-*sn*-глицеро-3-Ф-ацетилтрансфераза; X – 1-алкил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-Ф-фосфогидролаза; XI – ЦДФ-холин: 1-алкил-2-ацетил-*sn*-глицерол-холинфосфотрансфераза (ЕС 2.7.8.16). Используются следующие сокращения: алк – алкил; аци – ацил; аце – ацетил.

пути формирования ФАТ весьма важно: это позволяет избирательно подавлять образование ФАТ при воспалительных реакциях без вмешательства в его физиологическое генерирование.

Клеточное происхождение

Синтез ФАТ *de novo* осуществляется в большинстве тканей. Предполагается, что этот механизм формирования ФАТ действует в физиологических условиях, когда ФАТ может участвовать в функциональной регуляции плазматических мембран. Образование ФАТ посредством реутилизации происходит только в неко-

торых типах клеток, которые могут быть объединены в группу клеток, участвующих в воспалении. Наиболее представительными в данной группе клеток, генерирующих значительные количества ФАТ, являются эозинофилы (см. главу 5), макрофаги (см. главу 6) и нейтрофилы (см. главу 3); тромбоциты образуют лишь умеренные количества ФАТ (см. главу 4). Как базофилы, так и тучные клетки (см. главу 2) могут образовывать ФАТ при активации, однако значительного его выделения во внеклеточную среду при этом не происходит. В соответствии с такими различиями селективные антагонисты ФАТ могут уменьшать кожные реакции, обусловленные отложениями иммунных комплексов при вовлечении тромбоцитов

и нейтрофилов, не влияя на кожную анафилаксию с доминирующим участием активированных тучных клеток.

Из клеток, участвующих в воспалении, эозинофилы (см. главу 5) как источник ФАТ обладают наибольшим потенциалом. Значительный интерес представляет то обстоятельство, что в покоящихся эозинофилах отсутствует ацетил-КоА: 1-алкил-2-лизо-sn-глицеро-3-фосфорилхолинацетилтрансфераза, экспрессия которой становится заметной в активированных эозинофилах, полученных от больных с симптомами, связанными с выделением продуктов активированных эозинофилов.

Кроме образования ФАТ, клетки могут участвовать в его метаболизме. В некоторых типах клеток может быть достаточно выраженным повторное превращение в лизо-ФАТ (см. рис. 72), поскольку ацетилгидролаза обнаруживается во многих типах клеток и в плазме.

Такой метаболизм ФАТ характерен для макрофагов и эндотелиальных клеток. В то же время тромбоциты и нейтрофилы образуют незначительные количества лизо-ФАТ; в клетках данного типа ФАТ превращается в алкилглицерофосфорилхолина.

Биологическое действие

ФАТ оказывает действие на различные клетки, однако важнейшей его характеристикой является способность активировать тромбоциты.

Хотя в настоящее время принято преуменьшать значение этой активности, способность ФАТ индуцировать постоянную активацию воспалительных клеток у тех видов, на тромбоцитах которых экспрессированы рецепторы к ФАТ, свидетельствует о том, что активация тромбоцитов является центральным событием среди патологических эффектов ФАТ. В связи с тем что ФАТ может активировать тромбоциты, нейтрофилы, эозинофилы и мононуклеарные клетки, проявляя фармакологическую всеядность, для многих форм биологической активности ФАТ доминирующими являются события, вторичные для активации тромбоцитов или лейкоцитов. В то же время некоторые компоненты действия ФАТ являются прямыми для ряда клеток-мишеней, включая не только тромбоциты и лейкоциты, но также эндотелиальные (см. главу 8) и гладкомышечные клетки.

Активация тромбоцитов и лейкоцитов

Активация клеток под действием ФАТ особенно хорошо изучена на тромбоцитах (см. главу 4). При исследовании этих элементов крови достаточно хорошо документирована активация аденозилдифосфатом и метаболитами арахидоната, поэтому активацию под действием ФАТ можно отличить от этих процессов. В настоящее время общепризнанно, что активация ФАТ представляет собой самостоятельную форму активации тромбоцитов. В соответствии с этой интерпретацией выявлены рецепторы ФАТ, так как при использовании ФАТ, меченного радиоактивными изотопами, были обнаружены высокоаффинные места связывания на клеточных мембранах тромбоцитов. Взаимодействие ФАТ с такими местами связывания сопровождается входом в тромбоциты ионов кальция. Вероятно, данное взаимодействие имеет отношение и к активации других клеток, включая нейтрофилы (см. главу 3), мононуклеарные и гладкомышечные клетки. Однако следует отметить, что места связывания ФАТ могут альтернативно играть метаболическую роль, поскольку в присутствии селективных антагонистов наблюдаются изменения метаболизма ФАТ. Активация тромбоцитов или нейтрофилов ФАТ приводит к секреции или образованию биологически активных веществ, которые характеризуют реакцию данных элементов крови на ряд активационных стимулов и вносят свой вклад в неспецифические биологические эффекты ФАТ.

Сосудистые эффекты

При внутривенном введении ФАТ отмечается сложный характер реакции на этот фактор: прямые эффекты перекрываются непрямыми, которые возникают вследствие активации тромбоцитов и, в меньшей степени, лейкоцитов.

В ответ на однократное введение ФАТ происходит стремительное снижение артериального давления в течение 10-15 мин. Этот эффект, как полагают, определяется прежде всего прямым действием ФАТ на стенку сосудов (у некоторых видов, возможно, через механизм, зависимый от эндотелия; см. главу 8), поскольку вазодепрессивный ответ не уменьшается у животных с пониженным количеством тромбоцитов, а гладкие мышцы сосудов релаксируют *in vivo* при прямой аппликации ФАТ.

Однако не исключаются и непрямые эффекты, вносящие свой вклад в общий ответ, поскольку при этом отмечаются выраженная нейтропения и тромбоцитопения, связанная с накоплением агрегированных нейтрофилов и тромбоцитов в легких и печени. Вскоре после инъекции ФАТ повышается уровень циркулирующего TOA_2 и в плазме появляются биогенные амины, однако они не оказывают заметного влияния на гладкие мышцы сосудов, прореагировавших на ФАТ. Тот же механизм может обусловить повышенную проницаемость сосудов, на которую (в сосудах кожи) не влияет снижение количества тромбоцитов. Экстравазации белка плазмы в легких способствуют оба процесса - зависимый и независимый от тромбоцитов. Подобное различие тканевых эффектов может отражать способность ФАТ действовать в качестве релаксанта гладких мышц артериол, вызывая их расширение в отдельных областях.

Влияние на дыхательную систему

В отличие от сосудистой системы, реакции дыхательных путей на ФАТ зависят в основном от тромбоцитов. Так, острый бронхо-спазм, возникающий в результате экспозиции ФАТ, полностью отменяется предварительным снижением числа тромбоцитов антисывороткой. Следует учитывать, что бронхоспазм, вызванный ФАТ, может быть рефлекторно обусловленным событием, вторичным по отношению к отложению агрегатов тромбоцитов в капиллярах легочной циркуляции. Однако у морских свинок бронхokonстрикторный ответ на ФАТ не уменьшается ваготомией, а проявления бронхоспазма предшествуют отложению тромбоцитов. Поэтому вполне вероятно, что события, зависящие от тромбоцитов и приводящие к бронхоспазму, проявляются на ранних стадиях активации тромбоцитов, когда происходят изменения формы и образование микроагрегатов тромбоцитов. Предполагается, что спастическая реакция дыхательных путей возникает в результате секреции тромбоцитами спазмогена, так как индуцировать сокращение гладких мышц дыхательных путей *in vitro* можно только в присутствии тромбоцитов. Установить природу этого вещества пока не удается; однако предполагается, что образование тромбоксана вносит свой вклад в связи с ингибиторными эффектами *in vivo* нестероидных противовоспалительных препаратов.

Помимо способности вызывать бронхоспазм, ФАТ обладает более необычным свойством: он индуцирует продолжительную и бирательную гиперреактивность дыхательных путей. Она возникает после внутривенного введения или после ингаляции фактора, при этом эффект, как и бронхоспазм, за счет интактных циркулирующих тромбоцитов. Острая гиперреактивность не снижается уменьшением количества нейтрофилов вследствие введения антинейтрофильной сыворотки. Данные об участии эозинофилов в изменении реактивности дыхательных путей пока отсутствуют. Однако необходимо исключить вовлечение эозинофилов, поскольку клетки такого типа вызывают гиперреактивность, повреждая эпителий дыхательных путей, и их количество увеличивается в просвете дыхательных путей вскоре после введения ФАТ. Для признания Э1 воспалительного медиатора «необычным» достаточно наличия способности вызывать острую гиперреактивность дыхательных путей, однако существование подобной активности весьма впечатляет. Например, повышенная чувствительность к гистамину обнаруживалась у кроликов через неделю после однократного внутривенного введения ФАТ, а повышенная чувствительность к метахолину у добровольцев сохраняется до 4 нед после ингаляции ФАТ. У кроликов продолжительное повышение реактивности дыхательных путей к ФАТ выявляется параллельно воспалительной реакции, персистирующей несколько недель. В этом вполне вероятно, что воспалительная реакция определяет нарушение функции легочных путей, поскольку воспаление дыхательных путей при астме и гиперреактивность легких взаимосвязаны.

Влияние на желудочно-кишечный тракт

Ткани желудочно-кишечного тракта могут давать прямой ответ на ФАТ *in vitro*. Применение ФАТ *in vivo* вносит дополнительные спазмогенные эффекты, связанные с его активным действием на тромбоциты, лейкоциты и воспалительные клетки, которое приводит к образованию спазмогенов, таких как лейкотриены и тромбоксан A_2 , а также к делению депонированных аминов. Однако в ответ на ФАТ *in vivo* проявляется не острый спазм гладких мышц желудочно-кишечного тракта, а продолжительная воспалительная реакция. Так, внутрибрюшинная инъекция ФАТ вызывает длительную воспалительную реакцию.

ную реакцию, приводящую к некрозу тонкого кишечника. Совсем недавно установлено, что пероральное или системное введение ФАТ вызывает эрозии слизистой оболочки желудка и тонкого кишечника, что может быть использовано в качестве еще одной модели язвы желудка. Поскольку этот феномен проявляется у крыс, участие в нем тромбоцитов маловероятно.

Полученные данные свидетельствуют об уменьшении кровотока вследствие гипотонии и гемоконцентрации, лежащих в основе этого патологического события.

Влияние на почки

Признание неотличимости химической структуры АПЛП от структуры ФАТ указывает на определенную роль ФАТ в почках. ФАТ образуется клетками мозгового вещества и изолированными клубочками. Он может влиять на функцию почек, изменяя кровоток и проницаемость клубочков и вызывая сокращение мезангиальных клеток. Явные изменения этих параметров при введении ФАТ наблюдаются у крыс, у которых показана независимость его действия от активации тромбоцитов. Независимо от предшествующих механизмов ФАТ вызывает глубокие изменения функции почек и у собак. Как и в других органах, способность ФАТ вызывать длительное воспаление в почках подтверждает предположение о том, что его наличие в тканном материале следует учитывать при оценке воспалительных заболеваний этого органа. Возможно, утверждение, что ФАТ самостоятельно вызывает многие признаки клеточного воспаления, связанные с отложением иммунных комплексов в почечных клубочках, является ошибочным, однако ФАТ может определять ряд событий, ответственность за которые прежде возлагалась на компоненты комплементарного каскада.

Действие на кожу

Влияние ФАТ на состояние кожи привлекает определенное внимание ввиду его способности повышать проницаемость сосудов. В этом отношении ФАТ обладает исключительной активностью: пикограммовые количества вызывают явную экстравазацию плазменного белка в коже морских свинок. Это предполагает наличие способности ФАТ оказывать вазодилататорное действие, поскольку для

экстравазации белка плазмы в коже кроликов и подушечках лапок морских свинок необходима одновременная аппликация сосудорасширяющих простагландинов. Предварительное введение морским свинкам литической антитромбоцитарной сыворотки позволило показать, что низкие дозы ФАТ вызывают увеличение сосудистой проницаемости посредством механизма, независимого от активации тромбоцитов. Однако более высокие дозы ФАТ рекрутируют тромбоциты в место инъекции и вызывают миграцию ПМЯЛ с последующим их выходом во внесосудистое пространство. Накопление нейтрофилов сменяется смешанной клеточной инфильтрацией, в которой доминируют мононуклеарные клетки, включая активированные макрофаги. Последовательные изменения клеточной инфильтрации наблюдаются и в коже человека, где дополнительным признаком реакции на введение достаточно высоких доз ФАТ являются васкулиты. Динамика клеточных воспалительных процессов при введении ФАТ напоминает персистирующее воспаление некоторых органов. Так, при атопическом дерматите и крапивнице отмечаются признаки, свидетельствующие об участии ФАТ. Активно исследуется псориаз, поскольку при кожных проявлениях заболевания обнаруживаются преобладание нейтрофилов и повышение уровня ФАТ.

Влияние на репродуктивную систему

Оплодотворенные яйцеклетки млекопитающих продуцируют значительные количества ФАТ на самых ранних стадиях клеточного деления перед имплантацией. Образование ФАТ определяется и при культивировании *in vitro* тканей человеческих эмбрионов. Существует прямая корреляция между генерированием ФАТ и успешной имплантацией таких эмбрионов. Предполагается, что метаболическая активация бластоциты во время имплантации зависит от событий, связанных с участием тромбоцитов. Способность аналога ПП₂ нарушить имплантацию бластоциты у экспериментальных животных подтверждает эту гипотезу.

Роль ФАТ при патологических состояниях

При анализе влияния ФАТ на различные ткани непременно рассматривается потенциал данно-

го вещества как медиатора патологии; участие ФАТ в этом количестве особенно очевидно при воспалении. Сходство эффектов введения ФАТ и патологических процессов приводится как доказательство участия в них ФАТ, особенно когда это сходство дополняется использованием селективных антагонистов ФАТ, изменяющих проявления заболевания в экспериментальных моделях (у животных). На этом основании полагают, что ФАТ принимает участие в анафилаксии, астме, эндотоксическом шоке и отторжении трансплантата, а также в возникновении нефрита, артритов, псориаза и синдрома острого дыхательного дистресса.

Участие ФАТ при астме

Связь между аллергией и астмой была установлена при эпидемиологических исследованиях. Формально показано, что предъявление аллергена сенсibilизированным субъектам вызывает симптомы, соответствующие клинической астме. У сенсibilизированных больных аллергическая реакция легких обычно включает в себя острый бронхоспазм; в некоторых случаях он сменяется отсроченной длительной обструкцией дыхательных путей. Данное явление связывают с персистирующей гиперреактивностью дыхательных путей (см. главу 21 и рис. 89). Из этого следует, что медиатор аллергии (или комбинация медиаторов) может участвовать в наблюдаемом процессе. В качестве патогенетического механизма чаще всего предлагалась активация тучных клеток, однако от этой концепции пришлось отказаться ввиду серьезного несоответствия данных.

Предположение об активации тучных клеток и(или) образовании лейкотриенов как предпосылка к разработке новых антигистаминных препаратов нашло немало сторонников и продолжает получать подкрепление в некоторых исследованиях. Однако даже те оптимисты, которые по-прежнему остаются на этой позиции, не могут не заметить, что получение новых антиастматических препаратов не является следствием применения данной идеи. Так, препараты, стабилизирующие тучные клетки, постоянно обнаруживают свою эффективность при клинической астме. Вряд ли можно ожидать лучших результатов от лейкотриеновых антагонистов, профиль действия которых еще более ограничен по сравнению с препаратами, стабилизирующими тучные клетки. Не менее негативное заключение получено при использовании ингибитора липоксигеназы-пирипро-

ста. Ввиду столь мрачной оценки пересмотр основ астматической патологии был бы неразумным шагом, особенно с учетом того обстоятельства, что ФАТ предлагается в качестве центрального медиатора астмы.

Аргументом в пользу оценки лейкотриенов и других продуктов тучных клеток как медиаторов астмы служит их способность к индукции продолжительного бронхоспазма. Однако астма представляет собой воспалительное заболевание, при котором нарушение проходимости дыхательных путей в результате сокращения гладких мышц, будучи основным источником клинических симптомов, служит лишь косвенным индикатором заболевания. Следовательно, внимание должно быть привлечено к аллергическому медиатору с воспалительным действием и преимущественно персистирующими эффектами. На первый взгляд, ФАТ идеально удовлетворяет этим требованиям, поскольку он вызывает острый бронхоспазм, длительную обструкцию дыхательных путей, связанную с воспалением, и стабильную гиперреактивность дыхательных путей.

Воспроизведение различных симптомов астмы кажется достаточным основанием для признания ФАТ и исключения других медиаторов.

ФАТ является пока единственным идентифицированным медиатором, способным вызывать персистирующую неизбирательную гиперреактивность дыхательных путей. Кроме того, ФАТ является единственным аллергическим медиатором, который интенсивно стимулирует аккумуляцию эозинофилов и избирательно рекрутирует аллергические эозинофилы. Наконец, среди аллергических медиаторов это уникальный агент, стимулирующий опосредованное тромбоцитами сокращение гладких мышц.

Зависимость реакции ФАТ от тромбоцитов некоторые авторы рассматривают как решающий аргумент против участия данного медиатора в патогенезе астмы. Это положение отвергается получением доказательств участия тромбоцитов в астматической реакции, и сегодня уже имеется бесспорное доказательство того, что при астме тромбоциты присутствуют (и могут активироваться) в просвете дыхательных путей. Поэтому в настоящее время скорее необходимо найти объяснение любого возможного механизма патологии, нежели игнорировать данный факт; в связи с этим следует еще раз подчеркнуть, что ФАТ остается единственным медиатором аллергии, который

может воспроизвести феномен внутрилегочной аккумуляции тромбоцитов.

Теперь уже имеются весомые доказательства вовлечения ФАТ в астматические процессы: помимо индукции симптомов астмы у животных и людей, показано продуцирование ФАТ, сопровождающее эти симптомы, что предположительно обусловлено эозинофилами, которые, по-видимому, специально «экипированы» для генерирования данного фактора. Следовательно, можно спрогнозировать, что эффективные антиастматические препараты будут подавлять действие ФАТ (или препятствовать ему) на ткани дыхательных путей.

Бронхоспазм, вызываемый ФАТ, в этом отношении не имеет ничего примечательного, за исключением участия в нем активации тромбоцитов. Эта реакция успешно подавляется бронхорасширяющими антагонистами Р-адренорецепторов. Более интересен тот факт, что сокращение в ответ на ФАТ сильно подавляется кетотифеном и теofilлином в дозах, недостаточных для индукции заметных бронхорасширяющих эффектов. С другой стороны, хромогликат и глюкокортикоиды не подавляют острый бронхоспазм, вызываемый ФАТ. Неспособность хромогликата к такому подавлению свидетельствует против участия фактора в остром аллергическом бронхоспазме, поскольку хромогликат нередко полностью снимает эффект аллергена. Соответственно этому селективные антагонисты ФАТ также способны подавлять острый аллергический бронхоспазм, что подтверждает более ранние данные о доминирующей роли гистамина и метаболитов арахидоновой кислоты в бронхоспазме, вызванном ингаляцией аллергена.

Позднее начало реакции на аллерген указывает на преобладание воспалительных явлений. Так, агонисты Р-адренорецепторов не смягчают эту реакцию и не способны отменить подобную обструкцию. Показано, что ФАТ вызывает задержанные реакции в коже человека и в легких кролика; в каждом случае хромогликат способен предотвратить клиническое проявление реакций с поздним началом.

Реакции с поздним началом у больных астмой сопровождаются гиперреактивностью гладких мышц дыхательных путей и могут отменяться предварительным введением хромогликата, теofilлина, глюкокортикоидов или кетотифена, но не агонистов Р-адренорецепторов. Инфузия ФАТ вызывает резкое повышение реактивности гладких мышц у морских свинок; этот эффект также предупрежда-

ется указанными четырьмя группами профилактических антиастматических препаратов, но не агонистами Р-адренорецепторов, которые чаще всего усиливают реакцию на ФАТ. Молекулярный механизм подавления изменений реактивности дыхательных путей не установлен ни для одного из этих препаратов. В случае глюкокортикоидов, кетотифена и хромогликата подавление может быть связано с их способностью ингибировать накопление эозинофилов при ингаляции аллергена или ФАТ. Возможности этих препаратов как профилактических антиастматических средств не связаны с их другими свойствами, например с бронхорасширяющим или стабилизирующим тучные клетки эффектом, подавлением циклооксигеназного или липоксигеназного метаболизма, а также с антагонизмом в отношении аминов или лейкотриенов, поскольку соединения с этими специфическими характеристиками не уменьшают гиперреактивности, возникающей при введении ФАТ морским свинкам.

Применение антагонистов ФАТ при астме

Эффекты известных профилактических антиастматических препаратов подтверждают концепцию о центральном месте ФАТ в патологии астмы.

Однако было бы ошибкой считать на этом основании, что антагонисты ФАТ явятся некоей терапевтической панацеей, ибо тогда следует допустить, что благоприятные эффекты при астме определяются только этими свойствами и что существующие препараты являются недостаточными ингибиторами патологии, индуцированной ФАТ. Следует отметить, что глюкокортикоиды, кетотифен и хромогликат могут подавлять реакции на ФАТ столь же эффективно, как большинство известных селективных антагонистов ФАТ. Более того, необходимо еще раз подчеркнуть, что каждый из указанных препаратов обладает дополнительными эффектами - бронходилатацией, стабилизацией тучных клеток, антагонизмом с аминами и МДВ-А, а также противовоспалительным действием; все они вносят свой вклад в симптоматическую эффективность, на которую могут рассчитывать и больной, и врач, что усложняет их оценку и понимание, отсутствие которого является главным препятствием на пути к успеху при применении данного терапевтического подхода. Не говоря

уже об антагонистах ФАТ, которые однозначно представляются многообещающими препаратами для лечения астмы, вполне вероятно, что такие вещества (если они селективные) помогут точно определить роль ФАТ при астме и, следовательно, позволят подтвердить предположение, что антагонизм легочным эффектам ФАТ должен быть обязательным признаком новых профилактических антиастматических препаратов.

Заключение

ФАТ обладает многими свойствами медиатора воспалительных заболеваний. Существование уже известных и разработка новых препаратов, подавляющих вызванную ФАТ патологию в различных тканях, позволит очень быстро установить значение ФАТ при том или ином заболевании. Следует подчеркнуть, что в каждом случае исследователь должен исполь-

Таблица 21. Критерии оценки медиаторных систем

Критерии	Вещества, соответствующие критериям
1. Вызывают ли вещества ожидаемые эффекты?	
а) <i>in vivo</i>	
Краснота } Жар } Опухоль } { Вазодилатация	Г, БК, ПГ ₂ , ПГЕ ₂ , ФАТ, ЛК
Боль } { Повышение сосудистой проницаемости	Г, БК, ФАТ, ЛТВ ₄ (пмн-3) ЛК, С5а (пмн-3)
Нарушение функции, например спазм бронхов <i>in vivo</i>	С5а, ЛК, ЭХФ-4, ЛТВ ₄ , ФАТ, ИЛ-1, НХА, Г, БК (ПГ) Г, LTD ₄ , LTC ₄ , БК, ПГЕ _{2α} , ФАТ (тр-3)
б) <i>in vitro</i>	
Хемотаксис (полиморфно-ядерные клетки и/или моноциты/макрофаги)	С5а, ЛК, ФАТ, ЛТВ ₄ , НХА, ЭХФ-А
Секреция тучных клеток	С5а, С3а, ЛК
Активация нейтрофилов или макрофагов (секреция или выделение радикалов O ₂ и др.)	С5а, ЛТВ ₄ , ЛК, ФАТ, ИЛ-1, НХА, ЭХФ-А
Облегчение фагоцитоза	С3b
Спазм гладких мышц	Г, С5а, С3а, БК, LTD ₄ , LTC ₄ , ФАТ
2. Образуется ли и(или) выделяется ли вещество во время реакций?	Г, С5а, С3а, С3b, БК, ПГ, ТО, ЛТВ ₄ , ФАТ, ЛК, ИЛ-1, НХА, ЭХФ-А
Повреждение тканей: резорбция костей (повышенная активность остеокластов)	ИЛ-1
Репарация: фиброз (увеличение синтеза коллагена)	ИЛ-1
3. Необходимы ли ферменты для образования вещества и присутствуют ли они в активной форме во время реакций?	Г, компоненты комплемента, БК, эйкозаноиды
4. Существуют ли эндогенные механизмы для прекращения действия вещества?	Г, БК, С5а, С3а, С3b, ФАТ, ?ЛК, эйкозаноиды
5. Обладают ли фармакологическим действием агенты, изменяющие реакцию?	Г ¹ , ПГ ²
6. Экспериментальные или клинические состояния, при которых дефицит вещества приводит к снижению интенсивности реакции	С ³
7. Рецепторы к веществу, обнаруженные на соответствующих клетках адекватными методами	Г (на гладких мышцах), С5а, ЛТВ ₄ и ФАТ (на нейтрофилах), БК (на гладких мышцах), С3b и С3γ (на нейтрофилах и макрофагах)

¹ Некоторые аспекты гиперсенситивности немедленного типа модифицируются H₁-антагонистами.

² Некоторые аспекты воспаления модифицируются ингибиторами циклооксигеназы.

³ Дефицит С3 приводит к снижению резистентности к инфекциям.

ЛК – лимфокины; пмн-3 – зависимое от полиморфно-ядерных лейкоцитов; тр-3 – зависимое от тромбоцитов; НХА – нейтрофильная хемотаксическая активность; БК – брадикинин; ЭХФ-А – эозинофильный хемотаксический фактор анафилаксии; С – комплемент; Г – гистамин; LTC₄, LTD₄ – лейкотриены C₄ и D₄; ПГ – простагландины; ТО – тромбоксаны.

зывать жесткие критерии, подобные критериям Dale (см. разуме части 2), а не довольствоваться поверхностным анализом.

Резюме части 2

М. М. ДЕЙЛ (M. M. DALE)

В настоящее время вполне очевидно существование неопределенности и даже путаницы в отношении роли различных веществ, предложенных в качестве медиаторов. В главе 9 приведены критерии оценки веществ, претендующих на роль медиаторов при аллергии или воспалении. При формулировке этих критериев за основу были взяты положения, используемые для определения нейротрансмиттеров. При аллергии и воспалении ситуация гораздо сложнее, чем при нервной передаче, так как в первом случае наблюдается ряд различных реакций, осуществляемых многими типами клеток одновременно и(или) последовательно. Некоторые из этих реакций имеют более важное значение в каких-то определенных условиях. Например, выделение интерлейкина-1 весьма важно при ревматоидном артрите, а образование и выделение фактора активации тромбоцитов или лейкотриенов - при бронхиальной астме. Кроме того, некоторые медиаторы изменяют высвобождение других медиаторов (например, ФАТ и ИЛ-1 стимулируют выделение эйкозаноидов, а ПГЕ₂ уменьшает выделение лимфокинов), что еще больше усложняет анализ ситуации.

В главах этой части книги приведено детальное описание восьми различных медиаторных систем. Их краткая характеристика в соответствии с семью указанными критериями дана в табл. 21. В связи с необходимостью таблица значительно упрощена; более того, в нее не включены сложные формы регуляторной активности, которые описаны в части 2. Совершенно очевидно, однако, что недостаток необходимой информации для большинства медиаторов не позволяет использовать критерии 5, 6 и 7.

Некоторые вещества, о которых можно сказать, что они опосредуют нарушение функций (например, повреждение тканей при ревматоидном артрите), не включены в данный раздел и, следовательно, отсутствуют в табл. 21. Так, лизосомные ферменты и токсические продукты O₂, участвующие в повреждении тканей, описаны в главах 3 и 6 части 1.

Представляется очевидным, что некоторые (а возможно, и многие) медиаторы участвуют в какой-либо одной реакции, а точное значение любого конкретного медиатора может меняться в различных условиях. Более того, весьма вероятно, что ряд медиаторов еще предстоит открыть.

При экспериментальном подходе приходится изолировать особые элементы воспалительной реакции *in vitro* (хемотаксис, сокращение гладких мышц и др.) или *in vivo* (расширение сосудов, накопление клеток) с целью анализа действия медиатора и исследования пути его модификации (см. часть 4). В настоящее время трудно сказать, в какой степени можно экстраполировать используемые тесты (например, накопление клеток в губке, пропитанной каррагенином) на нежелательное воспаление *in vivo* (например, при ревматоидном артрите). Более точное определение каждого медиатора требует не только дальнейших экспериментальных исследований на различных моделях воспаления, но и (что более существенно) разработки фармакологических агентов, модифицирующих их действие, синтез, хранение, выделение и метаболизм.

Доступность новых агентов значительно облегчит анализ роли того или иного медиатора при различных аллергических и воспалительных состояниях, что, помимо углубления наших познаний, позволит улучшить лечение данных состояний.

Часть 3

Воспаление

Сосудистые изменения при воспалении и механизмы образования отека

Т. Дж. Вильямс (Т. J. Williams)

Кардинальные симптомы воспаления впервые были описаны Цельсом (около 78 г. до н. э.). И только относительно недавно стало понятно, что они могут быть связаны с изменениями кровеносных сосудов пораженных тканей. John Hunter (1793) описывал воспалительное покраснение как результат вазодилатации: «сосуды, как артерии, так и вены, в очаге воспаления на вид становятся более сосудистыми... и это я должен назвать действием дилатации». Он пришел к выводу, что воспалительная опухоль вызывается истечением плазмы: «это увеличение объема возникает вследствие экстравазации коагулирующей лимфы и (отчасти) сыворотки».

Изобретение микроскопа позволило детально исследовать подобные изменения, и наши знания существенно расширились благодаря таким исследователям, как немецкий патологоанатом Julius Cohnheim, который тщательно описал основные признаки воспалительной реакции. Cohnheim (1889) установил, что «интенсивность покраснения (очевидно, *caeteris paribus*) прямо пропорциональна степени дилатации и переполнения кровью». Далее он представил весьма спорные аргументы в пользу связи местного повышения тканевой температуры с увеличением притока крови. Позже Cohnheim (1889) на лягушках описал накопление лейкоцитов и его связь с отеком ткани: «после достижения места экзодусом, эмиграцией, или, как ее еще называют, экстравазацией корпускулярных элементов, здесь происходит увеличение трансудации жидкости, вследствие которой ячейки мезентерия или тканей языка инфильтрируются и отекают».

Cohnheim (1889) впервые предположил, что наблюдаемые изменения микрососудов могут быть результатом действия химических медиаторов, образующихся в ответ на воспалительный стимул: «Мы думаем, что удовлетворимся, предположив наличие химических изменений, наблюдающихся в соках и тканях *pari passu* при размножении тех организмов (микробов), которые вызывают четвертый признак - характерное воспалительное поврежде-

ние сосудистой стенки». Это провидческое предположение явилось предвестником интереса к химии воспаления, которая переросла в обширную и важную область фармакологии.

В фармакологии воспаления разработано три главных подхода. Первый из них основан на концепции подобия, которая впервые была предложена Thomas Lewis в 20-х годах при изучении гистамина. Lewis обнаружил, что местно введенный гистамин может вызывать эффекты слабой механической или термической травмы в коже человека. Исходя из этого, он предположил, что эндогенный гистамин или родственное ему вещество выделяется в ответ на травмирующий стимул. Данный критерий и сегодня остается важным признаком, используемым при определении всех медиаторов. Вторым подходом является изучение влияния селективных антагонистов или ингибиторов на воспалительные реакции. Такой подход привел к важнейшему выводу об убиквитарности гистамина как медиатора воспаления и к разработке антигистаминных препаратов. Третьим подходом является определение медиаторов в экссудатах или (*in vitro*) в супернатантах клеток. В настоящее время для этих целей существует целый ряд биологических и химических методов определения.

Характерные изменения микроциркуляции при воспалении будут обсуждаться вместе с веществами, которые их опосредуют.

Вазодилатация

Все кровеносные сосуды, за исключением капилляров, обладают монослоем эндотелиальных клеток, окруженных гладкомышечными клетками, способными изменять калибр сосудов. Капилляры состоят только из монослоя эндотелиальных клеток, и их калибр изменяется пассивно в зависимости от трансмурального гидростатического давления. Два фактора определяют кровоток в любой ткани: а) разница между системным артериальным и венозным

давлением, которая определяется сердечным выбросом и общей резистентностью сосудов; б) местная сосудистая резистентность ткани. Главной детерминантой местной сосудистой резистентности является тонус артериол. Артериолы физиологически отвечают: а) на увеличение артериального давления повышением тонуса (ауторегуляция); б) на суживающие (норадреналин) или расширяющие (ацетилхолин) вещества, выделяемые местными нервными окончаниями; в) на циркулирующие вазоактивные вещества (гормоны адреналин и ангиотензин II); г) на тканевые pO_2 и pCO_2 и другие метаболиты. В ответ на воспалительные стимулы из тканевой жидкости, а также клеток тканей, нервных окончаний и лейкоцитов локально выделяются сосудорасширяющие медиаторы. Их эффекты направлены на преодоление физиологически доминирующего тонуса артериол. После обсуждения некоторых методов измерения вазодилатации эти вещества будут кратко описаны в контексте реакций микроциркуляции на воспаление. Для более детального ознакомления с этими вазодилататорами читатель отсылается к главам 9, 10, 13, 14 и 16.

Методы измерения вазодилатации

Отрезки или полоски различных артерий и вен могут быть протестированы *in vitro* вазоактивными веществами; по изменению их длины или напряжения можно судить о влиянии на сосуды *in vivo*. Однако данный метод не позволяет определить действие веществ на микрососуды. Более корректным методом *in vitro* является измерение давления при чрессосудистой перфузии органа с постоянной скоростью потока, хотя при этом методе исследуемые препараты также вводятся в сосудистую систему. Прижизненная микроскопия (например, зашечного мешка хомячков или мезентерия крыс) представляет более прямой метод определения вазоактивности *in vivo*. Большая часть наших знаний о вазодилататорных медиаторах получена при исследовании кожи у человека и животных.

Измерение площади покраснения и визуальное определение его интенсивности дает важную информацию. Существуют и другие количественные методы, например измерение поверхностной температуры в различных точках контактными термисторами или термодатчиками, а также проведение сканирующей инфракрасной термографии. Разработана лазерная

система с использованием доплеровского эффекта, в которой длина волны монохроматического светового источника изменяется при движении эритроцитов в крови, что дает информацию о потоке эритроцитов. Применяются радиоизотопные методы. Некоторые из них основаны на распределении радиоактивной метки, введенной в артериальную циркуляцию, например захват радиоактивных микросфер, задержанных небольшими кровеносными сосудами. Другие методы основаны на клиренсе из тканей как показателе кровотока, например вымывание ^{133}Xe , введенного внутри-кожно.

Сосудорасширяющие медиаторы

Гистамин, введенный внутрикожно или выделенный тучными клетками (например, при местной IgE-зависимой аллергической реакции), вызывает возникновение волдыря (см. ниже), локальное покраснение, а также красный дермографизм. Местное покраснение обусловлено прямым сосудорасширяющим эффектом гистамина, а окружающий красный дермографизм связан с аксон-рефлексом, приводящим к выделению эндогенного дилататора из нервных окончаний кожи. Мощность гистамина как вазодилататора различается в разных тканях и у разных видов, что определяется вкладом H_1 - и H_2 -рецепторов в реакцию (см. главу 9).

Нонапептид брадикинин (или декапептид каллидин), введенный в ткани или образующийся в тканевой жидкости при воздействии калликрина на кининоген, вызывает расширение сосудов. Как и в случае с гистамином, с помощью различных агонистов и антагонистов идентифицированы два типа брадикинин-новых рецепторов. Наиболее общей формой рецептора является V_2 -рецептор, который стимулируется только интактным онапептидом. V_1 -рецепторы идентифицированы на некоторых гладких мышцах сосудов. Эти рецепторы стимулируются брадикинином, у которого отсутствует С-концевой аргинин в результате действия карбоксипептидазы N. Интересно, что экспрессия V_1 -рецептора увеличивается веществами, вызывающими тканевую травму, например эндотоксином.

Некоторые простагландины (PGI_1 , PGI_2 и PGI_3) являются сильными вазодилататорами во многих тканях. В отличие от гистамина и брадикинина, которые вызывают расширение сосудов вместе с увеличением их прони-

цаемости (см. ниже), простагландины обычно индуцируют селективную вазодилатацию. Однако у крыс и в коже некоторых людей в ответ на ПГЕ происходит выделение аминов тучных клеток. В этом случае повышается проницаемость микрососудов.

Ранее было обнаружено, что некоторые тканевые экстракты при внутривенном введении животным проявляют сильное вазодепрессивное действие. В настоящее время известно, что часть этих эффектов определяется наличием в экстрактах нейропептидов. Два из них интенсивно изучены: 11-аминокислотное вещество Р и 28-аминокислотный вазоактивный кишечный полипептид (**ВИП**). Оба пептида являются мощными вазодилататорами, а в некоторых тканях они способствуют усиленному выделению аминов из тучных клеток. Совсем недавно с помощью методов молекулярной биологии удалось выявить еще один сосудорасширяющий нейропептид. Обнаружено, что ген, кодирующий кальцитонин в щитовидной железе, кодирует и другие «фланкирующие» пептиды. Один из них-37-аминокислотный пептид, связанный с геном кальцитонина (ПГСК), также является сильным вазодилататором.

Вещество Р и **ВИП** вызывают местное покраснение кожи, волдыри и окружающий красный дермографизм у человека. Основным эффектом ПГСК-интенсивное и очень продолжительное местное покраснение, а волдыри и красный дермографизм возникают лишь при использовании высоких доз.

В отличие от простагландинов, которые прямо действуют на гладкомышечные клетки сосудов, вызывая их расслабление, брадикинин, вещество Р, **ВИП** и ПГСК опосредованно влияют на некоторые сосуды. В этих сосудах рецепторы для пептидов (впервые показано с ацетилхолином) находятся на эндотелиальных клетках. Стимуляция рецепторов *in vitro* вызывает выделение эндотелиальными клетками нестабильного вещества (релаксирующий фактор эндотелия, РФЭ), который стимулирует гуанилатциклазу в прилегающих гладкомышечных клетках, вызывая их расслабление (см. главу 8).

Вещество Р, **ВИП** и ПГСК найдены в кожных нервах человека, поэтому один из них (или более) может быть эндогенным медиатором аксон-рефлекса реакции красного дермографизма. Эти пептиды могут вносить важные нейрогенные компоненты при различных типах воспалительной реакции.

Отек

В норме кровеносные микрососуды обладают низкой проницаемостью для макромолекул; белки плазмы медленно циркулируют в крови и тканях, возвращаясь из тканей в кровь через лимфатические сосуды. Низкая проницаемость имеет важное значение для динамического равновесия жидкости в тканях. Разница осмотического давления по обе стороны кровеносного сосуда обусловлена более высокой концентрацией белка в плазме по сравнению с тканевой жидкостью. Эта разница несколько сглаживается гидростатическим давлением, имеющим тенденцию удалять жидкость из сосуда. В физиологических условиях любой дисбаланс компенсируется лимфатическим клиренсом. Ситуация драматически меняется при воспалительной реакции: устраняется барьер проницаемости и жидкость, обогащенная белком, вытекает из кровеносных микрососудов, переполняя лимфатические сосуды и вызывая отечность тканей.

Воспалительный отек часто определяется как следствие повреждения клеток эндотелия, что действительно наблюдается в некоторых условиях, например при повреждении химическими токсинами, высокой температурой или облучением. В то же время специфические механизмы активно участвуют в утечке белков плазмы, что указывает на функциональное значение отека. После краткого описания некоторых методов, используемых для измерения отека, эти механизмы и их возможная функция будут обсуждены ниже.

Методы измерения отека

Отек является наиболее легко определяемым количественным показателем воспаления, поэтому его измерение проводится повсеместно. Для многих исследований вполне адекватны очень простые методы. Утолщение кожи может определяться при измерении складки кожи кронциркулем, а увеличение объема стопы крыс-при помещении стопы в ртуть до фиксированного положения и при измерении вытесненного объема. Определяется изменение окружности сустава после внутрисуставного введения вещества, вызывающего воспаление. При исследованиях на животных используются различные красители. Красители Эванс голубой и пентамин голубой после внутривенного введения avidно связываются с альбумином. В таком случае количество красителя, накоп-

ленно в ткани, может быть использовано для измерения утечки белка. При кожных реакциях измеряется диаметр голубого окрашивания или проводится оценка интенсивности окрашивания. Можно удалить кожу, экстрагировать краску и ее количество определить спектрофотометрически. Применение радиоактивных изотопов представляет собой обычный метод измерения отека. Альбумин, меченный ^{125}I или ^{131}I , вводят внутривенно после внутрикожной инъекции агента, вызывающего воспаление. Через некоторое время животных забивают, удаляют образцы кожи, и их активность определяется с помощью гамма-счетчика. Полученные значения позволяют точно оценивать накопление в ткани альбумина плазмы.

Медиаторы, повышающие проницаемость микрососудов и оказывающие прямое действие на эндотелиальные клетки

В течение многих лет предполагалось, что медиаторы, такие как гистамин, вызывают утечку белков плазмы, действуя на мельчайшие сосуды-капилляры. Классические исследования, проведенные Majno и соавт. в начале 60-х годов, изменили данное представление. Эти исследователи вводили внутривенно крысам суспензии частиц угля (индийские чернила) или сульфид ртути, а затем инъецировали в мышцу-кремастер гистамин или 5-окситриптамин (5-ОТ). Через час, когда циркуляция очистилась печенью от суспензии, кремастер исследовали с помощью световой или электронной микроскопии. Микрососуды, в которых возникла утечка, имели пятнистую окраску вследствие задержки частиц. Под действием аминов в эндотелии образовывались промежутки, в которые проходили белки вместе с частицами. Однако белки впоследствии могли распространяться по тканям, а частицы задерживались периваскулярной базальной мембраной. Эти эксперименты наглядно показали, что «протекающими» сосудами в действительности являются небольшие посткапиллярные венулы.

Гистаминовые рецепторы предположительно находятся на посткапиллярных венулах. Гистамин вызывает сокращение эндотелия и временное открытие межэндотелиальных клеточных соединений (см. главу 8). 5-ОТ вызывает аналогичный эффект у грызунов (5-ОТ вместе с гистамином содержится в тучных клетках грызунов).

После проведения этих экспериментов были описаны некоторые другие медиаторы; все они

избирательно действуют на венулы, повышая их проницаемость. Чтобы отличать эти медиаторы от другого типа медиаторов, зависимых от полиморфно-ядерных лейкоцитов (см. ниже), их назвали «прямо действующие медиаторы, повышающие проницаемость». Кроме гистамина и 5-ОТ, к ним относятся брадикинин, каллидин, лейкотриены C_4 и D_4 , фактор активации тромбоцитов. Простагландины и тромбоксаны, как правило, слабо повышают проницаемость, за исключением некоторых эффектов, опосредуемых тучными клетками кожи, о чем упоминалось выше.

Взаимодействие медиаторов

В 1971 г. John Vane и соавт. предположили, что ацетилсалициловая кислота и другие нестероидные противовоспалительные препараты (НСПВП) подавляют воспаление в результате супрессии синтеза простагландинов (см. главы 10 и 25). Так как некоторые простагландины являются сильными вазодилататорами, с помощью этой теории нетрудно объяснить влияние НСПВП на гиперемию. Действие НСПВП на отек объяснить труднее, поскольку, как отмечалось выше, простагландины слабо влияют на проницаемость микрососудов. Объяснение было найдено, когда установили, что простагландины, обладающие мощным сосудорасширяющим действием, также сильно потенцируют отек, вызванный медиаторами, повышающими проницаемость, например гистамином и брадикинином. Соответственно показано, что эндогенные сосудорасширяющие простагландины и медиаторы, повышающие проницаемость, действуют синергично, вызывая отек в некоторых экспериментальных моделях. Предполагается, что простагландины, расширяя артериолы, повышают гидростатическое давление в просвете венул, вследствие чего увеличивается утечка белков, вызванная другим медиатором. Данная гипотеза была подтверждена недавними наблюдениями потенцирования образования отека сильными сосудорасширяющими пептидами ВИП и ПСГК.

Повышение проницаемости микрососудов хемоаттрактантами полиморфно-ядерных лейкоцитов

При исследовании отечных реакций на внутрикожное введение кроликам микробных стимулов (*Bordetella pertussis* или прогретые дрожжевые клетки- зимозан) было обнаружено, что

внутрикожное введение плазмы может имитировать эти реакции. Для этого плазму необходимо было сначала проинкубировать с микроорганизмами, а затем смешать с вазодилаторным простагландином. Активным началом плазмы является 74-аминокислотный компонент системы комплемента C5a-C5a человека и кроликов и их физиологически более стабильная форма дез-арг C5a активны на кожной модели кроликов. Дез-арг C5a образуется при отщеплении C-концевого аргинина карбокси-пептидазой N (тем же ферментом, который действует на брадикинин). Это контрастирует с *in vitro* активностью C5a человека, при которой высвобождается гистамин и которая полностью отменяется при потере аргинина C-конца. Кроме того, при реакции в коже кролика на плазму, активированную комплементом, очищенные C5a и дез-арг C5a не меняются под действием H1-антагонистов гистамина.

После внутрикожной инъекции C5a наблюдается короткий латентный период (примерно 6 мин) перед заметным протеканием, тогда как при введении гистамина и брадикинина реакция возникает через 1,5 мин. В этом эксперименте все вещества смешивали с ПГЕ₂, что свидетельствует об участии разных механизмов. C5a представляет собой сильный фактор хемотаксиса ПМЯЛ, поэтому реакции исследовались у кроликов с пониженным уровнем ПМЯЛ. У животных сохранялась нормальная реакция на внутрикожное введение брадикинина и гистамина, но отсутствовала реакция на C5a. Последующие эксперименты показали, что данные реакции можно восстановить переливанием крови от нормальных кроликов. Затем было обнаружено, что другие хемоаттрактанты ПМЯЛ-лейкотриен В₄ (ЛТВ₄) и ф. мет-лей-фен (ФМЛФ)-также вызывают отек при их смешивании с сосудорасширяющими простагландинами. Эти реакции отменяются при удалении ПМЯЛ.

В итоге было сделано заключение, что местное внесосудистое образование хемоаттрактантов вызывает быструю адгезию и эмиграцию ПМЯЛ в венах и что этот процесс разными путями приводит к раннему увеличению проницаемости венул.

Механизмы, участвующие в повышении проницаемости венул, которое индуцируется местным внесосудистым хемоаттрактантом, вероятно, достаточно сложны. Первым критическим этапом процесса является прикрепление ПМЯЛ к эндотелиальным клеткам микрососудов. Гистологически и при прижизненной мик-

роскопии такое прикрепление выявляется избирательно в венах. Причины подобной избирательности могут быть реологическими, а именно: силы потока, стремящиеся отделить прикрепившиеся клетки, в данной области выражены слабее. Альтернативный вариант: в этой области находятся специализированные эндотелиальные клетки. Неясно, какие клетки-ПМЯЛ или эндотелиальные клетки венул первично отвечают на внесосудистые хемоаттрактанты. *In vitro* ПМЯЛ в ответ на C5a, ЛТВ₄ и ФМЛФ агрегируют и обнаруживают повышенную прикрепляемость к поверхностям. Показано, что эти вещества увеличивают экспрессию некоторых поверхностных гликопротеинов ПМЯЛ, которые могут участвовать в прикреплении. Рядом исследователей отмечена увеличенная экспрессия других гликопротеинов на поверхности эндотелиальных клеток в ответ на интерлейкин-1 (см. главу 8). Таким образом, возможно, что некоторые хемоаттрактанты диффундируют из внесосудистого пространства в просвет макрососудов и активируют лейкоциты, а другие медиаторы активируют клетки эндотелия. Данная схема осложняется недавним сообщением о том, что участки кожи кроликов, в которые вводили C5a, вызывающий аккумуляцию ПМЯЛ, селективно десенсибилизируются к дальнейшему введению того же вещества. Предполагается, что первичным эффектом C5a является действие на тканевые клетки, возможно, на венозные эндотелиальные или неидентифицированные близко расположенные клетки.

Существуют две основные возможности аккумуляции ПМЯЛ для повышения проницаемости. Первая заключается в том, что межклеточные соединения эндотелиальных клеток остаются открытыми во время миграции лейкоцитов. Вторая возможность предполагает, что лейкоциты, тесно соприкасаясь с сосудистой стенкой, секретируют вторичный медиатор, который участвует в сокращении эндотелиальных клеток. Этот вопрос остается открытым. Однако показано, что некоторые вещества, избирательно подавляющие отек, зависимый от ПМЯЛ, не действуют на отек, индуцируемый медиаторами прямого действия: например, ПГ₂ • ПГ₂ увеличивает отек в комбинации с C5a, при внутрикожном (т. е. внесосудистом) введении. Напротив, внутривенное введение ПГ₂ в дозах, не оказывающих сосудорасширяющего действия, подавляет отек, вызванный C5a, и не влияет на отек, индуцированный брадикинином или гистамином. Дан-

ный эффект, вероятно, опосредуется повышением цАМФ в ПМЯЛ. Из всего этого следует, что ПМЯЛ могут служить мишенью при разработке новых противовоспалительных препаратов.

Оценка отека как функционального состояния

На рис. 74 показано, как наблюдения С5а могут соотноситься с теорией, объясняющей образование отека с точки зрения функционального процесса, возникающего вследствие проникновения микробов в ткани. Присутствие микробов запускает внесосудистую активацию комплемента в тканевой жидкости, которая приводит к микробному лизису и опсонизации. В связи с ограниченностью внесосудистого комплемента поставка компонентов комплемента из крови должна быть пропорциональной величине стимула, т.е. количеству присутствующих микробов. Вероятно, это регулируется двойственным продуктом активации - С5а. С5а и дез-арг С5а регулируют аккумуляцию ПМЯЛ, а они в свою очередь контролируют приток комплемента из крови посредством повышения проницаемости сосудов. В последующем лейкоциты мигрируют в ткани и фагоцитируют лизированные и(или) опсонизированные микробы. Начальная фаза выхода плазменного белка у некоторых видов может ускоряться аминами тучных клеток, выделение которых индуцируется С5а и другим «анафилаксинном»-С3а. Этот процесс, вероятно, имеет временный характер ввиду инактивации С3а и С5а как факторов высвобождения аминов под действием карбоксипептидазы N тканевой жидкости, хотя у некоторых видов (не у челове-

ка) дез-арг С5а сохраняет способность к деградации тучных клеток. Кроме того, для выделения и действия аминов, вероятно, возникает тахифилаксия, что свидетельствует о большой значимости отека, зависящего от ПМЯЛ, для пролонгированных реакций.

Медиаторы, участвующие в различных воспалительных реакциях

Имеются ли основания для отнесения воспалительной реакции, показанной на рис. 74, к другим типам воспаления? Описанная модель представляет неаллергическую реакцию с участием «альтернативного пути» активации комплемента, который запускается продуктами стенки микробных клеток. Все наблюдаемые здесь события могут быть в равной мере отнесены и к «классическому пути» активации, более эффективно запускаемому комплексами антиген - антитело, где повышенная проницаемость сосудов необходима и важна для поставки большего количества антител из крови наряду с компонентами комплемента. Реакция Артюса представляет собой пример ответа, индуцированного иммунными комплексами и, как известно, зависящего от синтеза простагландинов, активации комплемента и участия ПМЯЛ. Интересно, что, хотя при реакции Артюса и определяется образование С5а, ставший теперь доступным рецепторный антагонист ФАТ подавляет отек. Таким образом, в данной ситуации может существовать взаимодействие двух типов медиаторов. Наряду со стенкой микробных клеток и комплексами антиген - антитело многие вещества могут

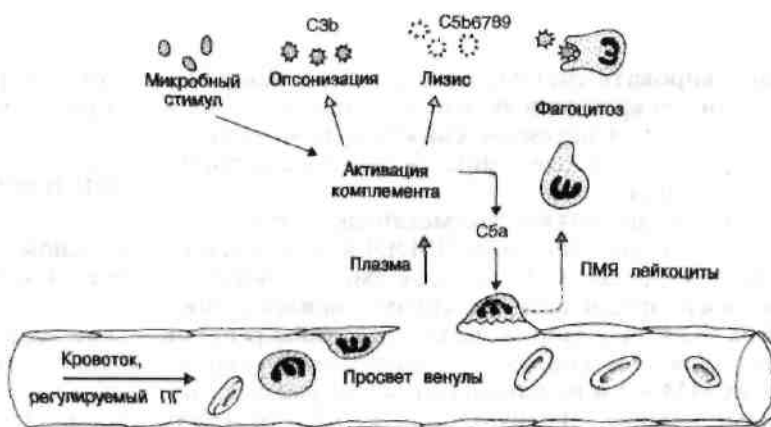


Рис. 74. Микроциркуляторная реакция на С5а; система контроля местного накопления ПМЯ лейкоцитов и плазменных белков в ответ на присутствие микробов в ткани.

Вещество	Место действия				
	Артериола		Венула		Облегчение отека
	Дилатация	Констрикция	Прямое повышение проницаемости	ПМЯ-зависимое повышение проницаемости	
Гистамин	+		+		+
Брадикинин	+		++		+
Простагландин E_2/L_2	+++				+
Лейкотриен D_4		+	++		+
Лейкотриен C_4		++	+		-
C5a				++	+
Лейкотриен B_4				++	+
Ф.мет-лей-фен				++	+
ФАТ	+		++		+
Вещество Р	+++		++		+
ВИП	+++				+
ПРГК	+++				+

Рис. 75. Классификация предполагаемых медиаторов воспаления по их месту и механизму действия на микроциркуляцию. Таблица составлена на основании данных, полученных на разных видах, поэтому следует учитывать существенные межвидовые различия. Кроме того, некоторые агенты (например, C5a, вещество Р) могут вызывать выделение гистамина (5-ОТ у грызунов) тучными клетками.

активировать систему комплемента, например ткани, поврежденные нагреванием или эндотоксинами. Системное снижение комплемента подавляет разные типы экспериментального воспаления.

Очевидно также, что механизмы, участвующие во взаимодействии ПМЯЛ и эндотелиальных клеток венул, могут и не иметь отношения к воспалительным реакциям, вовлекающим C5a. Конечно, многие различные типы реакций подавляются снижением уровня циркулирующих ПМЯЛ и не нарушаются при уменьшении комплемента. Важную роль в этих реакциях

могут играть лейкотриен B_4 или другие факторы хемотаксиса.

Заключение

В основе многих воспалительных реакций могут лежать определенные фундаментальные механизмы, вовлекающие различные химические вещества в зависимости от типа реакции, ткани и вида животных. В данной главе описаны механизмы, участвующие в формировании воспалительного отека, причем особое внима-

ние уделяется тем из них, посредством которых повышенная проницаемость венул вызывается рядом медиаторов и модулируется вазодилататорами, действующими на артериолы. На рис. 75 показано, как некоторые предполагаемые медиаторы классифицируются по способу и месту их действия на микрососудистое русло.

Со временем список таких медиаторов, безусловно, возрастет, и мы надеемся, что это будет происходить параллельно росту наших знаний о механизмах действия медиаторов. В заключение хотелось бы привести высказывание Julius Cohnheim (1889): «Вы увидите, что феномен, обозначаемый как четвертый в сосудистой области ввиду наибольшей гетерогенности факторов, представляет собой совершенно регулярную, постоянно повторяющуюся серию, и будете вполне вознаграждены за страдания, связанные с тщательным анализом».

18 Накопление клеток и воспаление

П. К. Уилкинсон (P. C. Wilkinson)

Большинство воспалительных реакций продолжительностью более нескольких часов характеризуется накоплением клеток в зоне воспаления. В тканях беспозвоночных зона воспаления изолируется клеточными реакциями, чужеродный материал и паразиты инкапсулируются и заключаются в цисты. Аналогом этого процесса являются реакции в ревматоидных узелках человека. Накопление клеток может происходить в любом месте по разным причинам. Здесь, вероятно, прежде всего надо сказать о механизме хемотаксиса, который наиболее легко объясним с точки зрения молекулярной фармакологии. В последние годы картина молекулярной фармакологии хемотаксических реакций нейтрофильных лейкоцитов несколько прояснилась. Получены весоые доказательства важной роли хемотаксиса в остром воспалительном процессе, при котором связь между причинным фактором (мобилизация клеток) и эффектом (накопление клеток) достаточно проста. Что касается других форм воспаления, то доказательств участия в них данного процесса пока мало. При хроническом воспалении, вероятно, многие факторы участвуют в накоплении клеток, поэтому причинно-следственная связь менее выражена. Прежде чем приступить к обсуждению более специфических фармакологических проблем, необходимо рассмотреть изменения, вызываемые в поведении лейкоцитов некоторыми лигандами, а также механизмы, которые могут участвовать в накоплении клеток.

Локомоция, вызванная лигандами

Большинству биологов хорошо известна характерная форма движущихся клеток. В них появляется широкий гиалиновый лидирующий конец (ламеллоподиум); позади него располагается тело клетки с ядром и цитоплазматическими органеллами, которое заканчивается узким хвостом (рис. 76, А). Когда клетка продвигается вперед, волны сокращения перекачываются в ней спереди назад, что сопровождается

ся током цитоплазмы в переднем направлении. Важный вопрос заключается в причине локомоторных событий: вызываются ли они внешними лигандами или внутренними сигналами? Ответ может быть получен при исследовании нестимулированных клеток в отношении локомоторной морфологии. Нейтрофилы, находящиеся в потоке крови, имеют сферическую форму. При их тщательном и мягком выделении из крови без охлаждения или при их помещении в капли сферическая форма сохраняется; лишь менее 5% нейтрофилов приобретают полярную форму. При добавлении ф. мет-лей-фен до соответствующей концентрации (10^{-8} - 10^{-9} М) вся популяция в течение 5 мин приобретает полярную морфологию. Это наблюдение четко свидетельствует о том, что нейтрофилы остаются неподвижными лишь до получения сигнала извне.

Накапливаются данные о том, что при переходе клеток от сферической к полярной форме происходит быстрое перераспределение рецепторов клеточной мембраны. При стимуляции ф. мет-лей-фен, кроме рецепторов к данному лиганду, наблюдается движение к передней части клеток и других рецепторов, таких как Fc и C3b (рис. 76, Б). Перераспределение рецепторов к формилпептидам выявляется и при стимуляции лейкотриеном B₄ (ЛТВ₄). Относительно механизмов перераспределения рецепторов пока мало известно, однако для движущейся клетки представляется весьма важной локализация ее сенсорного аппарата на переднем конце. Использование этого феномена для определения градиента концентрации обсуждается ниже. Следует отметить, что полярность формы и перераспределение рецепторов выявляются в клетках, находящихся в суспензии с равномерной концентрацией лиганда, и не зависят от наличия градиента. Если такие клетки оседают на соответствующем субстрате, то начинается их движение. Внешние проявления локомоторной реакции при этом зависят от расположения стимула в среде. Так, при изотропном стимуле наблюдается случайная локомоция, а при наличии градиента - направлен-

ное движение к источнику. Вероятно, это не означает отсутствия дискретных групп хемокинетических, хемотаксических или других факторов и скорее всего обусловлено тем, что поведение клеток определяется разницей в расположении молекул лиганда. Собственно движение, как правило, является сигнальным событием у нейтрофилов; характер их локомоторного поведения (см. ниже) зависит от окружающей среды (градиент, равномерная концентрация и др.), из которой клетка получает сигнал.

Механизмы аккумуляции клеток

Локомоторные механизмы (рис. 77)

Хемотаксис

Хемотаксис-это реакция, посредством которой химическое вещество определяет направление движения клеток. Она обычно сопровождается морфологической ориентацией клетки в направлении к источнику градиента концентрации химического вещества (при позитивном хемотаксисе) (рис. 78) или в противоположную сторону (при негативном хемотаксисе). При оценке клеточной аккумуляции вполне достаточно учета только позитивного хемотаксиса, поскольку клетки после достижения ими источника градиента вряд ли успеют продвинуться в направлении падения градиента, прежде чем произойдет их оседание.

Немало дискуссий посвящается выяснению того, каким образом лейкоциты определяют градиент- с помощью пространственного механизма, т. е. выявляя разницу концентрации лиганда вдоль собственной длины или временного механизма, при котором клетки, продвигаясь по градиенту, измеряют концентрацию в различных точках в разное время. Для этого необходима простая память. Первоначально был популярным пространственный механизм, поскольку не было сомнений в способности нейтрофилов определять градиент вне движения, но для этого требуются сложные расчеты. Предположение, что перемещение во времени свойственно не только клеткам, но и рецепторам, побудило к некоторой «модификации» временных механизмов; из них наибольшую популярность приобрел механизм, в котором движущиеся рецепторы связывают лиганд в той или иной точке в разное время. Перераспределение рецепторов при стимуляции на пе-

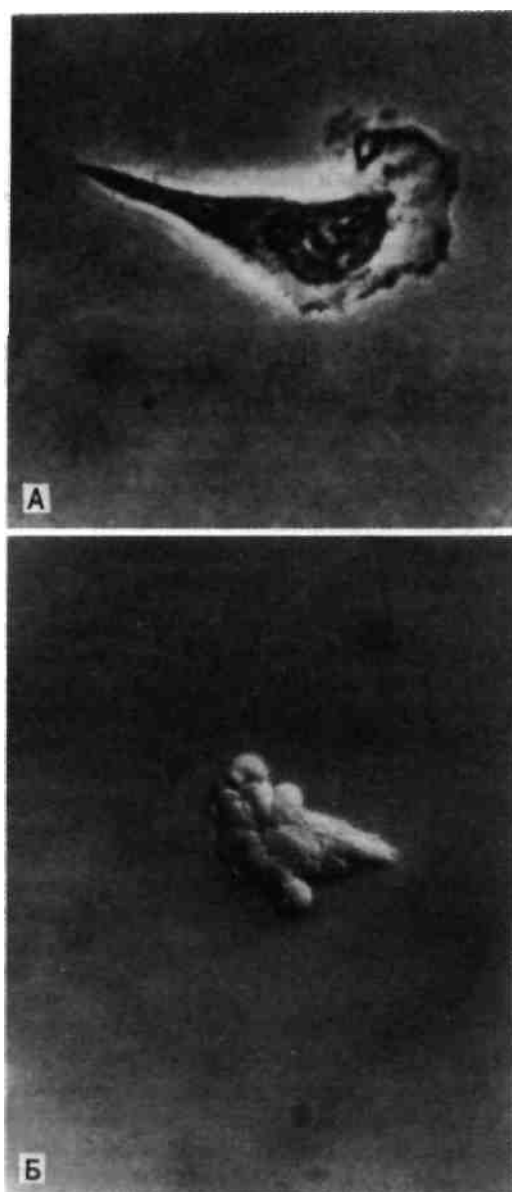
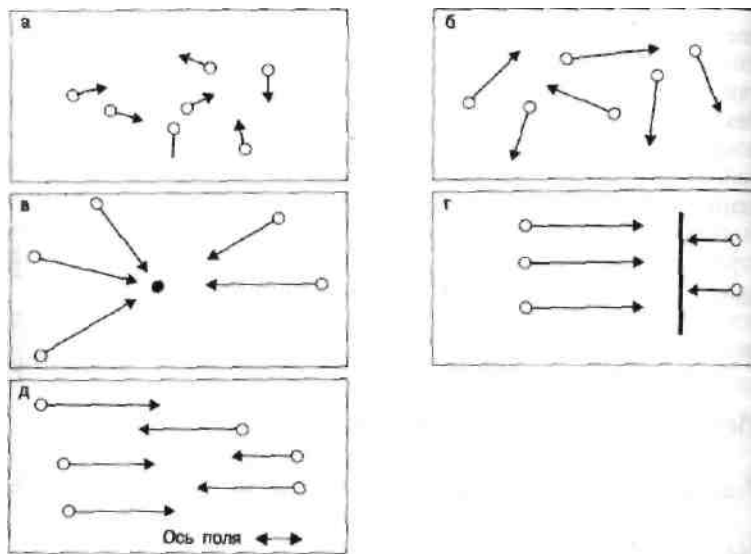


Рис. 76. А - морфология человеческого моноцита при локомоции (фазовый контраст). Следует отметить гиалиновую гребнеподобную вуаль на переднем конце клетки, а также характерную форму клетки, суживающейся к хвостовому концу. Б-морфология движущегося нейтрофила человека в присутствии ф.мет-лей-фен (оптика Normarski). Характер Fc-розеткообразования с эритроцитами, покрытыми антителами, поляризованной клетки свидетельствует о перераспределении рецепторов на переднюю часть клетки.

Рис. 77. Некоторые различия в движении клеток в зависимости от определенных условий. Длина и направление стрелок соответствуют распределению и направленности движения клеток; другие детали локомоции клеток не обозначены.

а-случайное движение; б-положительный хемотаксис расширяет поле смещения клеток без изменения его направления; вг- изменение движения в хемотаксическом градиенте, создаваемом точечным источником (в) и линейным источником (г); д-ориентирование тоже изменяет направление движения, но несколько иначе, чем хемотаксис (см. текст) [Wilkinson et al- In: Cell Analysis/Ed. N. Catsimpoalas- New York: Plenum Press, 1981].



реднюю часть клетки вне зависимости от наличия или отсутствия градиента предполагает следующее: если концентрация лиганда слишком низка и не позволяет отличить первый сигнал от последующих (например, для ф. мет-лей-фен 10^{-9} - 10^{-8} М), нейтрофилы отвечают на «первый толчок» лиганда поляризацией в направлении данного всплеска. Если это так, то при изотропной концентрации лиганда полярность разных клеток будет случайно направленной, как и последующее движение (хемотаксис).

В градиенте клетки скорее всего получают «первый толчок» на той стороне, которая обращена к наиболее высокой концентрации аттрактанта, и, следовательно, поляризуются

и упорядоченно продвигаются в этом направлении. Перераспределение рецепторов по направлению к ведущему концу соответствует предположению о движении клеток по градиенту. Таким образом, полярность и движение по градиенту могут быть обусловлены двойственностью стимула и не требуют какого-либо сложного клеточного механизма определения градиента. Следовательно, при слишком высокой концентрации аттрактанта клетки не способны различать «первый толчок» и выбрасывают несколько псевдоподий в разных направлениях. Именно это происходит с нейтрофилами при супраоптимальных концентрациях (10^{-6} М) ф. мет-лей-фен, поэтому их миграция бывает слабой.



Рис. 78. Ориентация нейтрофилов в градиенте C5a.

Источник градиента находится в правой части поля, и большинство клеток реагирует на него поляризацией (оптика Nomarski).

Хемотаксис

Термин «хемотаксис» охватывает целую группу явлений. По отношению к лейкоцитам хемотаксис обозначает реакцию, с помощью которой химические вещества определяют скорость движения клеток. Более точным термином в данном случае является «орхотаксис». Увеличение только скорости движения клеток не приводит к накоплению клеток. В действительности клетки, в окружении которых изменяется концентрация орхотаксического вещества (если вещество повышает скорость клеток), двигаются медленнее при низких концентрациях агента и в среднем проводят больше времени в местах с низкой концентрацией, а не с высокой. Это может быть обусловлено неслучайным распределением клеток, но тогда следует оценить механизм накопления клеток как крайне неэффективный. Однако если под действием орхотаксического агента клетки становятся более липкими, то при превышении оптимальной концентрации адгезивный эффект должен доминировать над локомоторным и клетки должны накапливаться в местах высокой концентрации такого агента. Мы проверили эту гипотезу, изучая движение нейтрофилов по двум сторонам мостика. На одну часть покровного стекла наносили бычий сывороточный альбумин (БСА), а на другую - БСА-анти-БСА иммунные комплексы. БСА обеспечивает хорошую поверхность для движения клеток.

По иммунным комплексам клетки передвигаются плохо, поскольку их движение тормозится связыванием собственных Fc-рецепторов с IgG, прикрепленным к поверхности. Клетки переходят с БСА на комплексы гораздо легче, чем в обратном направлении; наблюдается постоянное накопление нейтрофилов на иммунных комплексах. Нетрудно представить себе подобную ситуацию в очаге воспаления.

Клинотаксис, еще одна форма хемотаксиса, является реакцией, с помощью которой химические вещества изменяют частоту поворотов клетки. У лейкоцитов клинотаксис не обнаружен, поэтому нет необходимости в его обсуждении.

Реакции ориентирования

Направление движения клеток может определяться не только химическими реакциями, но и физическими характеристиками среды, в ко-

торой движутся клетки. Контактное ориентирование является реакцией, при которой движение клеток в структурированных тканях определяется осью ориентации. Обычно клетки предпочитают двигаться по оси выемок и не пересекать гребни между ними. Многие трехмерные матрицы, например фибриллы коллагена и фибриновые свертки, обладают ориентацией. Известно, что фибробласты и лейкоциты ориентируются вдоль оси таких матриц.

Следует отметить, что реакции ориентирования приводят к двустороннему движению, т.е. вверх-вниз или вдоль одной из осей фибрилл коллагена. Чаще движение осуществляется в двух направлениях, а не в одном, как при хемотаксисе. Контактное ориентирование как таковое не приводит к накоплению клеток. Однако нейтрофилы отвечают менее эффективно, если хемотаксические градиенты находятся под прямым углом к полю ориентирования, например в структурированной фиброзной ткани (по сравнению с ситуацией, когда оси обоих полей совпадают).

Контактное торможение локомоции

Когда подвижные фибробласты растут в тканевой культуре, у них отсутствует тенденция к наплыванию друг на друга; напротив, при соприкосновении их поверхностей движение прекращается. Такое подавление движения помогает клеткам формировать монослой, а не наплывать друг на друга. Злокачественные клетки часто теряют способность к контактному торможению. Лейкоциты - клетки, проникающие повсюду, поэтому проявление контактного торможения при их встрече с клетками других типов может привести к нарушению функции. Действительно, контактное торможение у лейкоцитов отсутствует, что позволяет им благополучно проникать под клетки любого типа в культуре. Таким образом, хотя контактное торможение является важным механизмом накопления клеток, на ранних стадиях развития клеточного воспаления оно, по-видимому, играет несущественную роль. Оно может иметь важное значение в более поздние стадии, например при заживлении ран, когда фибробластные и эпителиальные пласты передвигаются для восстановления целостности тканей.

Контактное торможение этих клеток при заживлении ран способствует формированию аккуратного рубца.

Механизмы адгезии

Задержка клеток при случайной миграции уже сама по себе может привести к их накоплению. Если центр воспалительного поражения является «липким пятном», то любая достигшая его клетка задерживается в нем. Этот механизм, вероятно, играет определенную роль в воспалении.

Многие факторы хемотаксиса лейкоцитов усиливают адгезию при их концентрации, превышающей хемотаксическую. Таким образом, можно предположить, что клетки, покидающие сосуд, первыми привлекаются градиентом хемотаксического фактора. Когда они достигают источника, где концентрация фактора высока, локомоция уменьшается (поскольку концентрация становится супраоптимальной на кривой доза- эффект), а их адгезия в то же время возрастает.

Подавление миграции

Лимфокины, подавляющие миграцию подвижных клеток, могут способствовать накоплению клеток при реакциях с участием клеточно-опосредованного иммунитета. В главе 14 описаны лимфокины, влияющие на макрофаги и полиморфно-ядерные лейкоциты.

Пролиферация клеток, поступающих в область воспаления

Клетки могут накапливаться в любом месте, поскольку после достижения какого-либо конкретного места они стимулируются к делению. Это может быть крайне важным механизмом при образовании хронической гранулемы, например при иммунных реакциях, когда образуются вещества, вызывающие бласттрансформацию лимфоцитов. Активированные лимфоциты в свою очередь выделяют вещества, увеличивающие количества макрофагов (см. главу 14). Данный механизм не имеет отношения к острому воспалению, поскольку нейтрофилы, характерные для такого воспаления, представляют собой неделимые терминальные клетки.

Сосудистые изменения

Усиленный выход лейкоцитов из сосудов вследствие повышения их проницаемости может увеличить прохождение клеток через любую ткань. Усиление кровотока в ткани также может увеличить такое прохождение. Однако

для эффективного накопления клеток требуются дополнительные механизмы.

Адгезия и локомоция

При изучении локомоции клеток *in vitro* поверхность, по которой движутся клетки, обычно называют субстратом. Адгезия является необходимым условием для движения на двухмерном (плоском) субстрате. Плохо прилипающие клетки не обладают достаточными возможностями для передвижения по субстрату. Вероятно, вследствие этого лимфоциты плохо передвигаются по двухмерным (2М) поверхностям. В то же время слишком сильно прилипающие клетки становятся неподвижными. Таким образом, 2М-субстрат не может быть адекватной моделью движения клеток *in vivo*, где клетки часто передвигаются по трехмерным матрицам. В таких матрицах адгезия может иметь менее важное значение для локомоции; это подтверждается тем фактом, что лимфоциты, плохо двигающиеся по 2М-субстрату, легко проходят через коллагеновый гель или под монослоями других типов клеток в тканевой культуре.

Многие методы определения клеточной адгезии основаны на прикреплении клеток к поверхности с их последующим механическим удалением. В действительности это скорее метод измерения открепления, нежели определения адгезии. Данное различие вовсе не тривиально.

Когда клетки прикрепляются к субстрату, они должны распластываться; такое поведение часто наблюдается, например, у активированных макрофагов. Распластанная клетка более устойчива к откреплению не из-за мощности удерживающих ее сил, а просто благодаря увеличению ее площади. Поэтому в условиях, где адгезия для двух клеток одинакова, распластанную клетку сдвинуть труднее, чем округлую. Удобными способами прямого измерения клеточной адгезии являются пропускание с контролируемой скоростью суспензии клеток через поверхность и определение количества прикрепившихся к ней клеток. Столь же простым методом измерения адгезии нейтрофилов является определение их агрегации. При активации, например, хемотаксическими факторами нейтрофилы становятся более липкими и затем агрегируют, что легко измерить агрегометром или счетчиком клеток. Наличие агрегации типа нейтрофил-нейтрофил может быть

достаточно искусственным показателем. Однако предположение, лежащее в основе этих методов, заключается в возможности существования параллелизма между адгезивностью, определяемой *in vitro*, и адгезией между нейтрофилом и эндотелием *in vivo*.

Маргинация и адгезия лейкоцитов *in vivo*

В нормальных условиях существует равновесие между циркулирующими нейтрофилами и клетками, маргинирующими на стенках сосудов, примерно половина из которых находится в каждом пуле в любой момент времени (см. главу 20). Физическая нагрузка или адреналин (*inter alia*) высвобождает маргинированные клетки в циркуляцию; напротив, циркулирующий эндотоксин переводит циркулирующие клетки в маргинированные. Последний феномен интересен в связи с возможностью увеличения адгезивности нейтрофилов кровеносного русла в результате внутрисосудистой активации комплемента и выделения C5a (см. главу 12). Это имеет важное значение при эндотоксическом шоке, а также при почечном гемодиализе и может являться генерализованным отражением локальных событий при воспалении. Вещества, выделяемые местно в воспаленной области, могут значительно увеличивать адгезивность лейкоцитов к эндотелию, действуя на оба типа клеток.

Какие факторы заставляют лейкоциты в больших количествах прилипать к сосудистому эндотелию воспаленной области? Предполагается несколько вариантов.

1. Простейшими могут быть физические факторы, такие как замедление кровотока в зоне воспаления, что уменьшает силу потока, которая в норме предупреждает адгезию. Это (вместе с открытием новых капилляров) благоприятствует повышенному поступлению лейкоцитов в воспаленную область.

2. Не решен вопрос о медиаторах, которые выделяются местно, но при попадании в циркуляцию могут изменять адгезивность всей популяции циркулирующих нейтрофилов тем же способом (хотя, возможно, и менее драматично), каким действует циркулирующий эндотоксин.

3. Однако наиболее реалистична гипотеза о местных изменениях либо эндотелия венул, либо лейкоцитов, которые приводят к увеличению их аффинности друг к другу. Очень важ-

ными являются результаты связывания между молекулами на лейкоцитах (LFA-1, CR3, p150.95) и на эндотелиальных клетках (ICAM-1) [Hynes, 1987]. Другое предположение заключается в том, что в воспаленном эндотелии тормозится выделение фактора, который в норме предупреждает адгезию лейкоцитов к эндотелию (как простаглицлин предупреждает адгезию тромбоцитов). Аспекты взаимодействия лейкоцитов и эндотелиальных клеток обсуждаются в главах 8 и 17.

Хемотаксис и хемотаксические факторы

Покинув кровеносные сосуды, лейкоциты мигрируют в центр повреждения. На основании исследований *in vivo* трудно предположить хемотаксическую природу миграции. В то же время при исследованиях *in vitro* получены веские доказательства способности лейкоцитов к точным и быстрым реакциям хемотаксиса; более детально они рассматриваются ниже.

Методы определения хемотаксиса

Существует ряд методов определения реакций лейкоцитов на факторы хемотаксиса. Наиболее широко используется определение с помощью микропоровых фильтров. Клетки при этом помещаются на верхнюю поверхность фильтра, а хемотаксический фактор — на нижнюю. Фактор диффундирует через фильтр, образуя градиент концентрации; в ответ лейкоциты начинают мигрировать через поры фильтра. В другом популярном определении используются ячейки, прорезанные в агарозе. Клетки на слайде помещают в ячейку; в отсутствие хемотаксического фактора они распределяются между агарозой и пластинкой, образуя правильное кольцо. Если рядом расположенная ячейка заполнена хемотаксическим фактором, клетки мигрируют в ее сторону дальше, чем клетки, находящиеся на противоположной стороне; поэтому в конце эксперимента клетки образуют кольцо яйцевидной формы.

Ни один из этих методов не позволяет четко дифференцировать хемотаксис и хемотаксис, хотя для этих целей и предлагаются специальные приемы. Превосходство имеет визуальная оценка, которая позволяет определить ориентацию клеток и пройденный ими путь. С помощью кино съемки показано, что лейко-

циты мигрируют по почти прямым линиям градиента хемотаксического фактора. Однако подобная киносъемка требует использования точных и сложных приборов и методов анализа. Поэтому проще показать хемотаксис, измеряя ось морфологической ориентации лейкоцитов в градиенте в фиксированные периоды времени. Это может быть сделано в простейшей ориентационной камере. В градиенте фактора, например С5а или формилпептидов (см. рис. 78), около 90% нормальных человеческих или кроличьих нейтрофилов ориентированы по направлению к источнику градиента.

Крайне простым и многообещающим методом определения активности лигандов является оценка их влияния на клеточную поляризацию в суспензии. Как упоминалось выше, бережно полученные лейкоциты крови имеют сферическую форму, а при стимуляции хемотаксическими пептидами они приобретают полярную форму. Определение может быть проведено менее чем за 30 мин и способно дать хорошие результаты по зависимости доза-эффект. При этом в связи с нахождением клеток в суспензии не проявляются вторичные эффекты лигандов, например адгезия.

Локомоция различных типов лейкоцитов

Локомоторные и хемотаксические реакции наиболее удобно наблюдать у нейтрофильных лейкоцитов, которые легче всего поддаются очистке. Именно эти клетки использовались в подавляющем большинстве исследований (табл. 22). Моноциты хорошо отвечают на многие хемотаксические факторы нейтрофилов (например, формилпептиды, С5а, ЛТВ₄). Воспалительные макрофаги (например, мышинные перитонеальные макрофаги, индуцированные тиогликолатом) реагируют на те же факторы, а резидентные макрофаги, некоторое время присутствующие в тканях, обычно обладают слабой локомоцией и низким хемотаксисом. Кроме того, хемотаксис выявлен у эозинофилов (см. главу 5). Популяции активированных лимфоцитов, эффекторных лимфоцитов и лимфобластов более подвижны, чем непримированные клетки, причем *in vivo* их движение направлено преимущественно в места воспаления.

Многие лимфоциты венозной крови неспособны к немедленному ответу на локомоторную стимуляцию, а при культивировании с митогеном большая часть популяции приоб-

ретает полярную морфологию и подвижность (в первые 24 ч). Подобным эффектом обладают ФГА, конканавалин А и, что наиболее интересно, моноклональные анти-СО-3-антитела. Поскольку рецептор СО-3 тесно связан с рецептором для антигена, это можно использовать в качестве модели индукции локомоции с помощью антигена. Возможно, локомоторная активность приобретается лимфоцитами при переходе из фазы G₀ в фазу G, клеточного цикла. Об аттрактантах лимфоцитов, к сожалению, известно очень мало. Лимфоциты не отвечают на классические аттрактанты нейтрофилов (формилпептиды, С5а или ЛТВ₄) и реагируют на неидентифицированные молекулы сыворотки и на частично охарактеризованные белки, которые выделяются в культуре лимфоцитами, стимулированными митогенами (предположительно лимфокины) (см. главу 14).

Хемотаксическое распознавание

Лейкоциты реагируют на множество несущих опасность стимулов, поэтому для нормального осуществления своих функций защиты от инфекции или очищения организма от поврежденных тканей они должны обладать большой функциональной гибкостью и способностью к распознаванию целого ряда хемотаксических факторов и частиц, подлежащих фагоцитозу. Часть распознавания осуществляется с помощью специфических рецепторов для хемотаксических факторов (таких как С5а или формилпептиды) или для частиц, опсонизированных СЗЬ или антителами (см. главу 3). Другие формы распознавания носят относительно неспецифический характер. Например, лейкоциты поглощают латексные бусы, существование рецепторов для которых трудно даже предположить. Описано множество хемотаксических факторов; классификация некоторых из них приведена в табл. 22. Однако большинство из них слишком мало изучено и поэтому не может использоваться для исследования функции распознавания. Ниже описаны хемотаксические факторы, доступные в очищенной форме и используемые в биохимических исследованиях.

Хемотаксические факторы N-

формилметиониновые пептиды

При получении синтетических формилметиониновых пептидов, которые являются мощны-

Таблица 22. Некоторые хемотаксические факторы лейкоцитов

Факторы	Комментарии
Экзогенные Формилметионилпептиды Непленифицированные бактериальные пептиды и липиды	Многие бактерии привлекают лейкоциты не прямым действием, а посредством активации комплемента (как это наблюдается, например, у клеток, зараженных вирусами)
Эндогенные Гуморальные C5a Другие компоненты комплемента, например C3a или другие продукты расщепления C5 Производные других каскадов, например фибринопептиды	C5a генерируется при активации комплемента, например протеазами эндотоксина, иммунными комплексами и др (см. главу 12); C3a активен только в высоких концентрациях
Клеточного происхождения Продукты иммунных реакций Лимфокины (факторы лимфоцитарного происхождения, ФЛП) Макрофагальные ФЛП Нейтрофильные ФЛП Эозинофильные ФЛП а) зависимые от иммунных комплексов б) промоторы стимуляции эозинофилов Лимфоцитарные ФЛП Антиген	См. главу 14 Хорошо изучены Мало изучены Выделяются при контакте с эозинофилами
Производные арахидоната: ЛТВ ₄ , ФАТ Выделяемые продукты нейтрофилов	Клетки, несущие антитела, обладают умеренным локомоторным ответом на специфический антиген См. главу 10 Высвобождаются, например, под действием кристаллоуратов, при фагоцитозе или контакте с поверхностями покрытыми Ig Продукты опухолевых клеток в основном привлекают макрофаги
Выделяемые продукты других клеток, например опухолевых или тучных клеток Ростовые факторы, например ФРТ Продукты тканевого повреждения, например денатурированные белки, α ₂ M-протеазные комплексы	«Некротаксис» к поврежденным клеткам, например после тепловой травмы

ми хемотаксическими факторами, исходили из следующих предпосылок: нейтрофилы способны распознавать продукты прокариотических клеток, которые не обнаруживаются в клетках эукариотов (см. главу 3). Так как прокариоты начинают синтез белка с N-формилметионина, а эукариотические клетки не используют этот путь, то формилметиониновые пептиды представляются подходящими кандидатами в лиганды для подобной распознающей системы. Синтетические формильные пептиды обладают биологической активностью. Активные синтетические пептиды ничтожно малы (например, трипептиды типа ф.мет-лей-фен). Для них показано насыщаемое и высокоаффинное связывание K_d около 10^9 М) с рецепторами плазматических мембран нейтрофилов. Необходимым условием для активных пептидов является наличие белка аминокислоты N-конца (желательно с формильной группой), а также гидрофобность остатков С-конца. L-пептиды обладают большей активностью, чем D-пепти-

ды. В первой позиции наличие метионина не является обязательным, его можно заменить норлейцином.

C5a

Это основной хемотаксический пептид, образующийся при активации комплемента (см. главу 12). Он представляет собой гликозилированный 74-аминокислотный пептид, отщепляющийся триптическим гидролизом от α-цепи C5. C5a, вероятно, является наиболее важным хемотаксическим фактором, так как он может образовываться классическим или альтернативным путем активации на поверхности бактерий и других клеток, даже если они сами не выделяют хемотаксические факторы. C5a способствует хемотаксическому распознаванию частиц лейкоцитами, которые не могут распознавать на расстоянии чужеродные или поврежденные объекты иным (кроме указанного) способом.

Значимость C5a подчеркивается тем обстоятельством, что люди с дефицитом C5 болеют повторными тяжелыми бактериальными инфекциями. C5a высокоаффинно (K_d около 10^{-9} М) связывает рецепторы на поверхности нейтрофилов, причем они отличаются от рецепторов для формилпептидов (см. главу 3). При отщеплении С-концевого аргинина карбоксипептидазой (инактиватор анафилатоксина), присутствующей в нормальной человеческой сыворотке, образуется дез-арг C5a. Дез-арг C5a также обладает активностью фактора хемотаксиса нейтрофилов и моноцитов человека, но в концентрациях на порядок выше, чем у нативного C5a (максимальные эффективные концентрации- 10^{-7} М и 10^{-8} М соответственно). Установлено, что активность дез-арг C5a усиливается в присутствии «фактора помощи» сыворотки. Как и C5a, интактная молекула C5 может приобрести хемотаксическую активность после обработки трипсином или тромбином.

Липиды

В настоящее время значительный интерес в качестве факторов хемотаксиса представляют производные арахидоната, активированные липоксигеназой. Вероятно, наиболее активным из них является ЛТВ₄, который максимально эффективен в наномолярных количествах (см. главы 3 и 10). У ЛТВ₄ выявлены тонкие структурные особенности, необходимые для проявления активности, и специфические рецепторы к нему на поверхности нейтрофилов. Целый ряд других липидов обладает аналогичной активностью, но менее выраженной, чем у ЛТВ₄, в том числе фактор активации тромбоцитов и моно-ОЭТЭ (хотя в гораздо более высоких концентрациях, чем ЛТВ₄).

Продукты повреждения тканей

Повреждение клеток тканей в культуре часто сопровождается быстрым хемотаксисом соседних лейкоцитов к поврежденным клеткам. Нам неизвестно, какие вещества распознают эти лейкоциты. Лейкоциты могут распознавать различные денатурированные белки и отвечать на них реакцией хемотаксиса, возможно, в связи с увеличением их гидрофобности, возникающей при нарушении третичной структуры, что приводит к повышению аффинитета таких белков к поверхности нейтрофилов. Для максимальной активности необходима достаточно

высокая концентрация денатурированных белков, и пока неясно, является ли этот процесс обычным рецепторным распознаванием. Интересным примером могут служить данные, полученные при исследовании аз-макроглобулина (a_2M). Это крупный белок, действующий как ингибитор протеаз. Ингибирование достигается связыванием протеаз со специфическим центром a_2M . После связывания протеаз происходит конформационное изменение молекулы a_2M , в результате чего a_2M , действуя, как мухоловка, обволакивает собой протеазу. Комплекс a_2M -протеаза в отличие от нативного a_2M распознается и поглощается фагоцитами. Таким образом, здесь действует двух-этапный восстановительный процесс, при котором a_2M прежде всего удаляет воспалительные протеазы; затем сам a_2M -протеазный комплекс удаляется лейкоцитами. Вероятно, как и в случае с денатурированными белками, лейкоциты распознают конформационные изменения a_2M .

Другие хемотаксические факторы

Другие описанные хемотаксические факторы недостаточно изучены и поэтому не могут использоваться при фармакологическом анализе. К ним относятся хемотаксические лимфокины, из которых наиболее хорошо охарактеризован макрофагальный аттрактант. Предполагается, что эти факторы имеют важное значение для привлечения клеток в места клеточно-опосредованных реакций, хотя весомых доказательств этого пока немного. В некоторых исследованиях показано, что факторы роста (такие как ростовой фактор из тромбоцитов и фактор роста нервов) являются локомоторными аттрактантами лейкоцитов. Предполагается, что РФТ обладает специфичностью к мононуклеарным фагоцитам.

Нехемотаксические эффекты хемотаксических факторов и их значение при воспалении

Ранее упоминалось, что хемотаксические факторы вызывают различные изменения функций нейтрофилов, которые будут описаны ниже.

Адгезивные изменения

Формилпептиды и C5a вызывают немедленное и проходящее увеличение адгезивности нейтро-

филов, которое начинается через несколько секунд и длится несколько минут. Этот процесс лучше всего определяется быстрыми методами, например с помощью агрегометрии или путем подсчета клеток специальным счетчиком. При использовании методов медленной регистрации увеличение адгезивности может не обнаруживаться. Многие хемотаксические факторы вызывают и более длительные изменения адгезивности, которые зависят от дозы. Через 30 мин после добавления хемотаксического фактора в низкой дозе отмечается уменьшение адгезии, а при добавлении высокой дозы — ее увеличение.

Секреция и хемотаксис

Хемотаксические факторы вызывают слияние нейтрофильных гранул с цитоплазматической мембраной, а также выделение их содержимого в среду. Содержимое специфических гранул выделяется быстро. Кроме того, как отмечалось в главе 3, выделение может происходить и во время хемотаксиса. Выделение может индуцироваться под действием A23187 или форболмиристилацетата. Возможно, азурофильные (лизосомные) гранулы опорожняются медленнее и только в случае серьезного повреждения плазматических мембран. Для стимуляции выделения ферментов азурофильных гранул (например, Р-глюкуронидазы) требуются более высокие концентрации хемотаксических факторов, чем для выделения веществ, содержащихся в специфических гранулах, для чего обычно используется цитохалазин В. Кроме того, что специфические гранулы служат источником криптолических рецепторов (см. главу 3), предполагается, что они представляют собой секреторные гранулы, поскольку содержат хемотаксические факторы, например лактоферрин, обладает важными внеклеточными функциями, связывая экстрацеллюлярное железо (бактерии используют его как ростовой фактор), и, возможно, участвует в регуляции гранулоцитопоза. Напротив, азурофильные гранулы в норме выполняют внутриклеточные функции, сливаясь с фагосомами. Одно из наиболее интересных наблюдений было сделано при изучении процесса последовательного опорожнения гранул у нейтрофилов, стимулированных к фагоцитозу частицами латекса. Прежде всего выделяется содержимое специфических гранул, включая протеазы, расщепляющие С5 с образованием С5а, который привлекает к месту стимуляции соседние нейтрофилы. Позже на-

чинает выделяться содержимое азурофильных гранул, в том числе фермент, расщепляющий С5а и устраняющий хемотаксическую активность. Вероятно, здесь имеет место регуляторный механизм, поскольку продукты, выделяемые нейтрофилами, сначала активируют хемотаксические факторы и усиливают аккумуляцию клеток, а затем разрушают их и выключают стимул.

Влияние на метаболизм

Формилпептиды и С5а стимулируют метаболический взрыв в нейтрофилах (см. главу 3). Однако это наблюдается лишь при концентрациях, значительно превышающих оптимальную концентрацию для хемотаксиса. Совершенно очевидно, что метаболический взрыв не является необходимым для хемотаксиса. Хемотаксические факторы не вызывают метаболического взрыва у больных хроническим гранулематозом, хотя способность к хемотаксису нейтрофилов у таких больных сохраняется.

Значение при воспалении

Все вышеуказанные изменения предназначены для достижения максимальной эффективности нейтрофилов в воспалительной реакции. Предполагается, что события разворачиваются по следующему сценарию: быстрое увеличение адгезивности вследствие контакта с хемотаксическими факторами приводит к адгезии лейкоцитов и их диапедезу через эндотелий сосудов. Далее по мере миграции лейкоцитов в тканях по градиенту источника они последовательно подвергаются воздействию хемотаксического фактора в различных концентрациях — от низкой до оптимальной. В этих условиях секреция гидролаз отсутствует, поскольку для нее требуется контакт с бактериями или поврежденными тканями в центре воспаления. Клетки достигают градиента источника и остаются в нем. Здесь происходит мобилизация гранул и метаболический взрыв, необходимый для успешной деструкции бактерий, а высокая местная концентрация хемотаксического фактора стимулирует данные функции (см. также главу 3).

Регуляция хемотаксических реакций

Описаны некоторые ингибиторы локомоции лейкоцитов, которые могут действовать как

регуляторы воспалительных реакций. Выше уже упоминались ингибиторы C5a, выделяемые клетками. Возможно, важное значение имеют другие ингибиторы системы комплемента. Ряд ингибиторов может действовать непосредственно на клетки. Одним из механизмов действия может быть увеличение адгезии клеток в точке, предупреждающей локомоцию.

Предполагают, что лимфокин, угнетающий миграцию макрофагов, может действовать именно таким образом. Описаны и некоторые другие, еще плохо изученные ингибиторы, обнаруживаемые в сыворотке или выделяемые лимфоцитами или другими клетками. В настоящее время еще рано судить об их значимости в качестве регуляторов клеточной аккумуляции и воспаления.

Одним из убиквитарных веществ, влияющих на хемотаксические реакции, является гиалуроновая кислота. Эта гигантская гидратированная молекула не только физически препятствует клеточной локомоции, но и стерически нарушает доступ хемотаксических факторов к рецепторам клеточной мембраны. В заключе-

ние следует сказать, что очень важной представляется разработка конкурентных антагонистов, действующих на рецепторы клеточной мембраны. (Конкурентные антагонисты ф.метлей-фен описаны в главе 3.) Целесообразной была бы и разработка антагонистов, действующих на рецептор к C5a. Лекарственные препараты, разработанные на основе этих молекул, могут иметь и клиническое значение, например, при лечении тканевых повреждений, вызванных аутоиммунными комплексами, когда необходимо подавление нежелательной и разрушающей ткани нейтрофильной инфильтрации.

Двигательный аппарат лейкоцитов

Цитоплазма лейкоцитов содержит большое количество актина-белка, который при полимеризации образует длинные микрофиламенты.

В скелетной мускулатуре сокращение достигается скольжением актина по параллельным нитям миозина. Однако в клетках тканей не

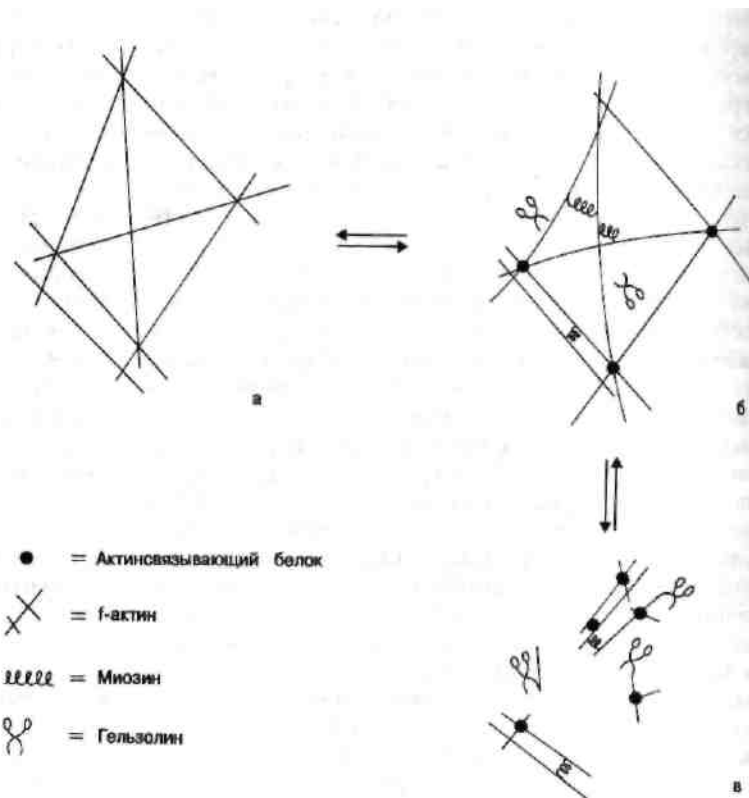


Рис. 79. Возможные связи между белками при формировании и разрушении сети актиновых нитей.

Сеть филаментов (а) сшивается (б) актинсвязывающим белком с образованием плотного геля, который сокращается под действием миозина в присутствии Mg^{2+} и АТФ. При повышении внутриклеточной концентрации кальция гелзолин разрушает решетку (в). Этот рисунок, как и рисунок 80, основан на модели Hartwig и соавт. (1980), а также Wilkinson (1982).

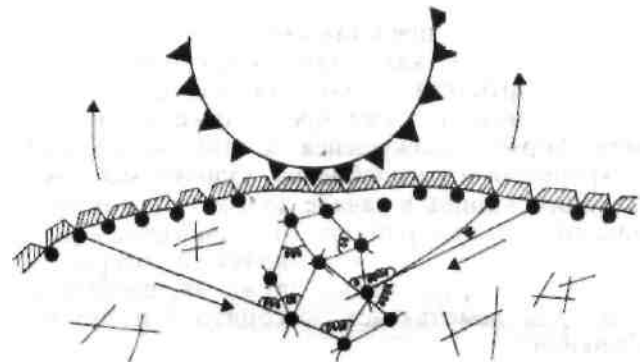
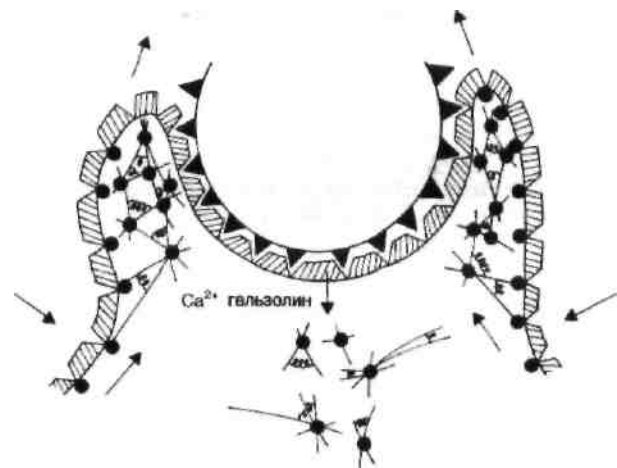


Рис. 80. Возможный механизм формирования микрофиламентной решетки при фагоцитозе.

При связывании лиганда со своим рецептором актинсвязывающий белок вытесняется из клеточной мембраны и связывается с актином, причем образуется гель, который сокращается под действием миозина, как показано на рис. 79. Прилежащая мембрана при этом приближается к поглощаемой частице. По мере латерального распространения лиганд-рецепторных взаимодействий происходит образование геля в концах формирующейся псевдоподии (нижняя часть рисунка). В то же время первоначальный гель, находящийся в основании фагосомы, изолируется вследствие активации гельзолином при входе кальция в цитоплазму (обозначения те же, что на рис. 79).



наблюдается постоянного сопряжения актина и миозина (аналогично мышечным саркомерам), а количество миозина во много раз меньше, чем актина. Актин макрофагов полимеризуется *in vitro* с образованием геля, который сокращается в присутствии миозина, Mg^{2+} и АТФ. Сократимость актинового геля является основой подвижности клеток. При электронной микроскопии обнаружено, что в лейкоцитах филаменты актина объединены в плотную сеть, которая особенно заметна в цитоплазме, предлежащей к активированной области плазматической мембраны, например, в местах контакта клетки с субстратом или прикрепления фагоцитируемых частиц, а также в переднем конце движущихся клеток. Как полагают, данная сеть формируется перекрестным связыванием актиновых нитей специализированным белком. Это обуславливает ри-

гидность сети филаментов, что приводит к формированию геля. Перекрестно связанный гель сокращается при взаимодействии миозина с соседними нитями актина в присутствии Mg^{2+} АТФ и белкового кофактора (возможно, киназы легкой цепи миозина; рис. 79). При высокой концентрации кальция в цитоплазме другой белок, гельзолин, разрушает связанные актиновые решетки и прикрепляется к более короткому концу образовавшихся несвязанных актиновых нитей. Еще один белок, акументин, прикрепляется к другому концу. В результате гель превращается в золь. Такой механизм позволяет совершить, повторные сокращения и контролировать движение клеток. Данная модель основана на работах Stossel и соавт., использовавших в качестве объекта исследования макрофаги. Авторы предположили, что подобный «двигатель» отвечает за клеточные

движения, возникающие при хемотаксисе и фагоцитозе.

На рис. 80 представлена схема, на которой показано, как «двигатель» работает в фагоцитирующей клетке. На основании этой модели можно также предположить изменения формы движущейся клетки вследствие сокращения и расслабления. Однако мы пока находимся лишь в начале долгого пути познания того, как координируются движения в различных частях клетки, позволяя ей совершать плавные и эффективные движения, необходимые для хемотаксиса, фагоцитоза и других функций. Микротрубочки также могут вносить опре-

деленный вклад в эту координацию. При визуальной оценке обнаружено, что препараты, вызывающие дезагрегацию микротрубочек (колхицин и винбластин), не подавляют способности лейкоцитов к распознаванию и движению по градиенту хемотаксических факторов или к фагоцитозу частиц. Однако движение клеток, обработанных такими препаратами, становится ошибочным и настолько плохо координированным, что их перемещение к источнику хемотаксиса напоминает походку пьяного. Что же касается механизмов регуляторно-го действия микротрубочек на молекулярном уровне, информации об этом пока еще слишком мало.

Лихорадка, или пирексия, представляет собой одно из основных проявлений инфекции, хронического воспаления, некоторых злокачественных новообразований и ряда других заболеваний. Связи между пирогенезом (или формированием лихорадки) и патофизиологией реакции организма на внедрение чужеродного агента далеки от ясного понимания. Тем не менее признано, что мононуклеарные клетки, играющие жизненно важную роль в иммунных и воспалительных реакциях при внедрении чужеродных организмов и при хронических воспалительных заболеваниях, являются интегральным компонентом патогенеза лихорадки. В контексте экспериментальных данных в главе обсуждается гипотеза о физиологическом значении пирексии.

Регуляция температуры тела

У людей температуру тела (внутреннюю) измерить нелегко, поэтому обычно измеряется оральная температура (в полости рта), которая по своим значениям близка к внутренней. Средняя нормальная температура полости рта человека составляет 36,6 °С. В течение суток наблюдаются ритмические изменения температуры (в среднем до 0,4 °С) с подъемом в 18 ч и минимальным значением в 6 ч. Сенсорный аппарат, участвующий в регуляции температуры тела, состоит из: 1) рецепторов гипоталамуса и спинного мозга, которые осуществляют контроль температуры крови; 2) рецепторов кожи, определяющих внешнюю температуру.

Гипоталамус, вероятно, является центром, куда поступает сенсорная информация для инициации адекватного ответа. Основные механизмы поддержания температуры тела перечислены ниже.

Механизмы теплопродукции: 1) усиление метаболизма в результате секреции гормонов щитовидной железы и надпочечников; 2) сужение периферических сосудов; 3) дрожание.

Механизмы теплоотдачи: 1) перифе-

рическая вазодилатация; 2) потение; 3) уменьшение секреции гормонов щитовидной железы и надпочечников.

Пути терморегуляции в центральной нервной системе изучены недостаточно, однако известно, что термогенными являются нейроны, использующие для передачи 5-окситриптамин, а норадреналиновые нейроны уменьшают внутреннюю температуру. Некоторые аспекты механизмов, контролирующих терморегуляцию в норме, важны для понимания патогенеза лихорадки.

Гипотермия может иметь ряд причин, включая, например, длительное пребывание на холоде или гипотиреозидизм. Снижение внутренней температуры происходит в результате истощения механизмов, контролирующих теплоотдачу. При чрезмерной выработке телом тепла наблюдается заметное потение, ведущее к дегидратации и потере тепла; если гипертермия не компенсируется, возникает изнуряющий жар.

Лихорадка принципиально отличается от нормальной реакции на чрезмерную выработку или потерю тепла. При гипотермии установка на нормальную температуру сохраняется, хотя действительная температура слишком низка. При гипертермии также сохраняется установка на нормальную температуру в условиях высокой действительной температуры. При лихорадке температура тела повышается, но меняется и установка в сторону более высоких значений, и механизмы теплоотдачи и теплопродукции функционируют для их достижения. У животных с искусственной лихорадкой наблюдается стремление к выбору более теплого места. При прямой регистрации электрической активности термочувствительных нейронов переднего гипоталамуса после введения пирогена обнаруживается ее снижение в нейронах, чувствительных к теплу, и повышение в нейронах, чувствительных к холоду. Таким образом, при повышенной температуре у больного могут наблюдаться дрожание и вазоконстрикция, с помощью которых температура повышается до нового уровня. Но даже при

лихорадке, если внутренняя температура превышает вновь установленный уровень, включаются механизмы потения и периферической вазодилатации, которые стремятся снизить температуру до установленного лихорадочного уровня.

Пирогены

Таким образом, лихорадка представляет собой переключение гипоталамического температурного регулятора на более высокий уровень. Возникает вопрос: как повышается установочная точка. В 1943 г. было обнаружено, что инъекция белка воспалительного экссудата вызывает лихорадку. Вскоре после этого наблюдения было показано, что моноциты крови синтезируют вещество, которое при введении вызывает пирогенную реакцию. Роль микроорганизмов стала ясна после выяснения липополисахаридной природы эндотоксина грамотрицательных бактерий, который является частью бактериальной стенки. Хорошо известно, что сам липополисахарид вызывает лихорадку у людей. В изящном раннем исследовании антигена *Salmonella Westphal* установил природу пирогенного липополисахарида (рис. 81). В действительности активной частью липополисахарида является липид А, а полисахарид служит для представления липида А в растворимой форме. Конъюгаты липида А и бычьего сывороточного альбумина обладают всеми свойствами липополисахарида, за исключением свойств, связанных с иммунным ответом на полисахарид¹. Ряд других веществ, кроме эндотоксина и продуктов лейкоцитов, вызывает лихорадку, поэтому возникает вопрос об общих механизмах. Пирогенами являются грамположительные бактерии, вирусы и опухоли. Лихорадка может сопровождать гиперсенситивность, особенно II и IV типов по классификации Gell и Coombs.

Общим механизмом возникновения лихорадки в ответ на различные пирогены или пирогенные состояния является лейкоцитарный продукт, первоначально названный эндогенным пирогеном, а в настоящее время известный как интерлейкин-1 (см. главу 15). Как уже упоминалось выше, в самых ранних наб-

людениях было обнаружено, что введение экстрактов лейкоцитов вызывает лихорадку у экспериментальных животных. Известно также, что у лейкопеничных животных ослаблен пирогенный ответ на бактериальный эндотоксин. Пирогенная реакция при этом отсрочена (от одного до нескольких часов) и при повторных инъекциях эндотоксина выявляется толерантность. Более того, антитела к эндотоксину не предупреждают пирогенной реакции на токсин даже при их избытке, а радиоактивно меченный эндотоксин локализуется не в гипоталамусе, где осуществляется терморегуляция, а в клетках фагоцитов мононуклеарной серии в крови, печени, селезенке и лимфатических узлах. Объяснение этого факта заключается в том, что лихорадку вызывает эндогенный пироген (интерлейкин-1), вырабатываемый лейкоцитами и действующий на температурный центр гипоталамуса. Прямое введение интерлейкина-1 в передний гипоталамус вызывает лихорадку уже через несколько минут (без латентного периода в несколько часов).

При введении эндотоксина происходит стимуляция лейкоцитов и начинается синтез интерлейкина-1, который поступает в циркуляцию и действует на рецепторы, локализуемые главным образом в гипоталамусе. Рецепторы к интерлейкину-1 имеются также в стволе мозга и других отделах центральной нервной системы. Здесь важно отметить, что интерлейкин-1 в норме не проникает через гематоэнцефалический барьер. Вероятно, существует специальный механизм, посредством которого интерлейкин-1 достигает преоптической области переднего гипоталамуса. Представлены доказательства, что это происходит в сосудистой терминальной пластинке, которая является структурой, окружающей желудочки мозга; она лишена гематоэнцефалического барьера и располагается вблизи медиальной преоптической области переднего гипоталамуса.

Инкубация *in vitro* лейкоцитов с эндотоксином приводит к образованию интерлейкина-1. *In vivo* интерлейкин-1 начинает оказывать действие с латентным периодом в несколько минут после введения животным. Для развития пирогенной реакции после введения эндотоксина животным необходим латентный период в несколько часов для синтеза лейкоцитами интерлейкина-1, поскольку нестимулированные клетки не содержат совсем или содержат лишь незначительное количество активного лимфокина. Ингибиторы синтеза белка предупреждают развитие пирогенной реакции на

¹ Помимо лихорадки, липополисахарид вызывает нейтропению, сменяющуюся нейтрофилией (см. главу 20), активацию комплемента альтернативным путем (см. главу 12), внутрисосудистую коагуляцию и гипотензию.

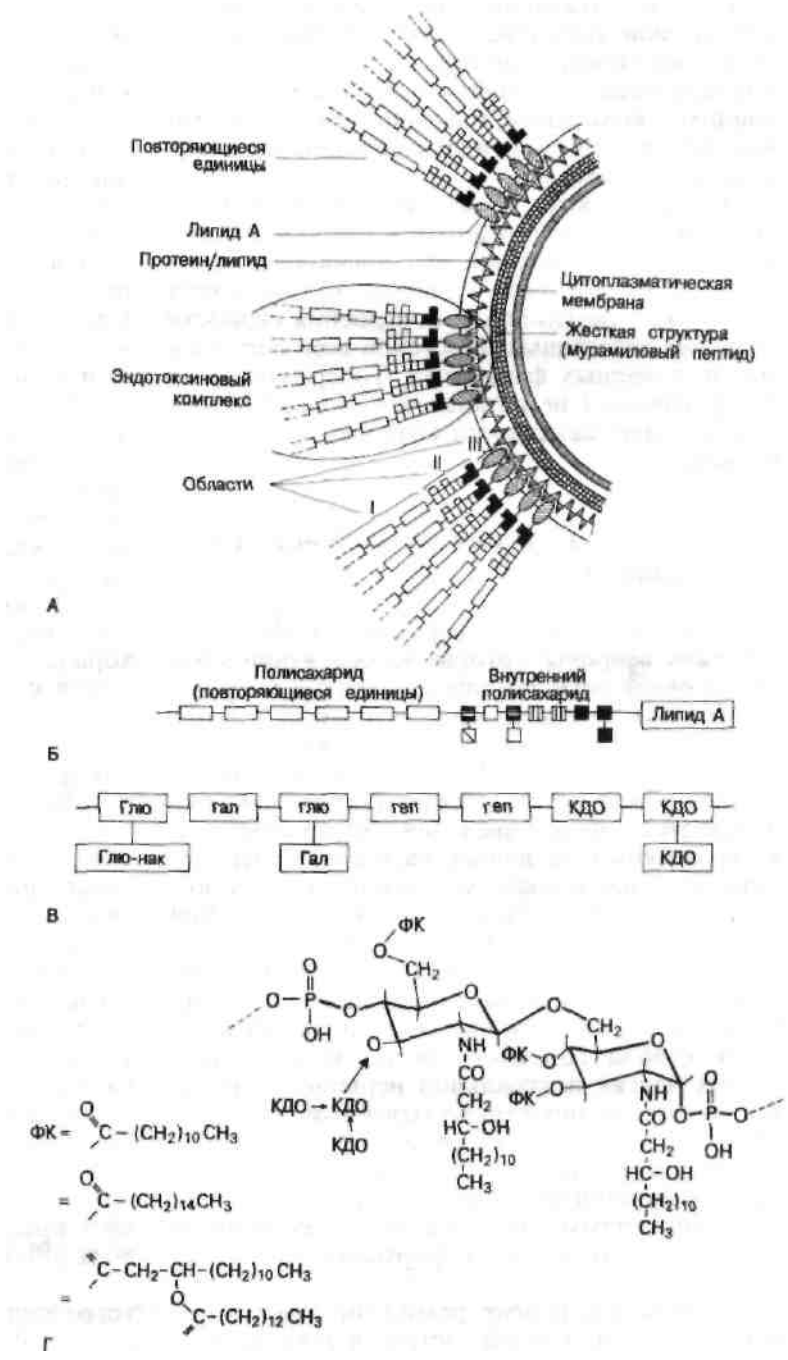


Рис. 81. А-структура клеточной стенки Salmonella; Б - структура липополисахарида; В-структура внутреннего липополисахарида (область II); Г-структура липида А (область III)

эндотоксин, тормозя синтез интерлейкина-1 в лейкоцитах.

Фагоцитоз бактерий или иммунных комплексов вызывает образование интерлейкина-1 в лейкоцитах при грамположительных инфекциях и некоторых состояниях повышенной чув-

ствительности. При клеточно-опосредованных иммунных реакциях, в которых участвуют лимфоциты, интерлейкин-1, как полагают, образуется мононуклеарными фагоцитами, активированными лимфокином, образованным стимулированными лимфоцитами.

Помимо указанных патофизиологических механизмов, образование интерлейкина-1 лейкоцитами может инициироваться рядом фармакологических препаратов, в том числе стероидом этиохоланом, блеомицином и синтетическими полинуклеотидами полиинозином и полицитозинном.

Толерантность к экзогенным пирогенам обусловлена, по-видимому, уменьшением образования лейкоцитами интерлейкина-1 в ответ на повторную стимуляцию, но она может быть также результатом повышения скорости удаления экзогенных пирогенов всей системой мононуклеарных фагоцитов. Толерантность к интерлейкину-1 не развивается. Более подробное описание активности интерлейкина-1 дано в главе 15.

Механизмы действия интерлейкина-1 при лихорадке

Как уже указывалось, передний гипоталамус содержит нейроны, которые на основании внутриклеточной регистрации температуры определяются как нейроны, чувствительные к теплу или холоду. При регистрации активности было установлено, что в нейронах, чувствительных к холоду, скорость разрядов избирательно увеличивается после введения интерлейкина-1. Интерлейкин-1 не влияет на клетки, расположенные в нескольких миллиметрах от зоны, чувствительной к холоду, а также на задний гипоталамус. Однако после разрушения переднего гипоталамуса лихорадка может индуцироваться внутривенным введением интерлейкина-1, а также прямой его аппликацией в области ствола головного мозга и некоторых других частях центральной нервной системы. Более того, радиоактивно меченный интерлейкин-1 связывается с центрами не только в переднем гипоталамусе, но и в других частях ЦНС. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что гипоталамус является не единственным местом, участвующим в формировании лихорадки.

Связь между рецепторами к интерлейкину-1 в центральной нервной системе и активностью нейронов, чувствительных к холоду, не является прямой. Экспериментальные исследования показывают, что простагландины (особенно простагландин E_1) могут быть медиаторами, которые связывают активацию рецептора к интерлейкину-1 с реакцией нейронов, чувствительных к холоду.

Простагландин E_1 находится в гипоталамусе в концентрации примерно 60 нг/г ткани. Более того, при перфузии желудочков через канюлю, расположенную в третьем желудочке, ПГЕ1 может определяться в спинномозговой жидкости на уровне 1-10 нг/мин. При индукции лихорадки грамотрицательными бактериями уровень ПГЕ1 в спинномозговой жидкости возрастает в 2,5-4 раза (рис. 82).

Введение ПГЕ1 в преоптическую область переднего гипоталамуса вызывает лихорадку, чего не наблюдается при такой же инъекции в задний гипоталамус. Меченый ПГЕ1 введенный в мозг, локализуется в гипоталамусе.

Лекарственные препараты, ацетилсалициловая кислота и парацетамол, долгое время были известны своим антипиретическим действием. В начале 70-х годов выяснилось, что большинство эффектов так называемых антипиретических анальгетиков или противовоспалительных нестероидных препаратов (см. главу 25) может быть обусловлено их способностью подавлять синтез простагландинов. Лихорадка, индуцированная эндотоксином, приводит к повышению уровня ПГЕ1 в спинномозговой жидкости, а парацетамол блокирует выделение ПГЕ1 и пирогенный ответ на эндотоксин (см. рис. 82). В большинстве случаев антипиретические препараты не блокируют лихорадку, вызванную введением ПГЕ1 в передний гипоталамус, что свидетельствует в пользу точки зрения о блокаде этими препаратами синтеза ПГЕ1 и подавления лихорадки посредством этого механизма.

Несомненно, ПГЕ1 опосредуют лихорадку у некоторых видов, действуя на передний гипоталамус. Однако есть сомнения в том, что только этот механизм является связующим патофизиологическим звеном между пирогеном и пирогенной реакцией. Например, у ягнят введение пирогена в гипоталамус вызывает лихорадку, чего не происходит при введении простагландина. Показано также, что антагонист простагландина не блокирует лихорадку, вызванную пирогеном, в отличие от лихорадки, индуцированной простагландинами. Более того, подъем концентрации ПГЕ1 в спинномозговой жидкости при лихорадке уменьшается нестероидными противовоспалительными препаратами, хотя фебрильная температура сохраняется. Как уже упоминалось выше, преоптическая область переднего гипоталамуса не является единственной областью головного мозга, отвечающей за интерлейкин-1. Показано, что при повреждении данной части мозга

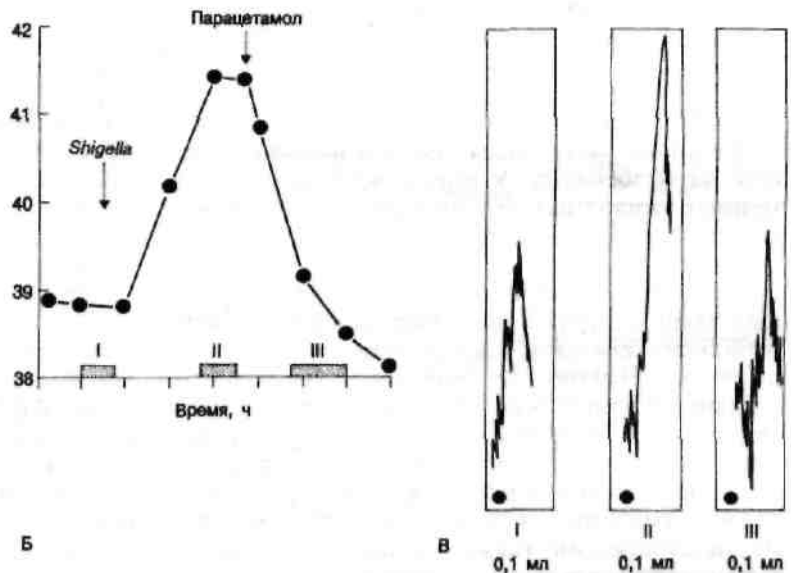
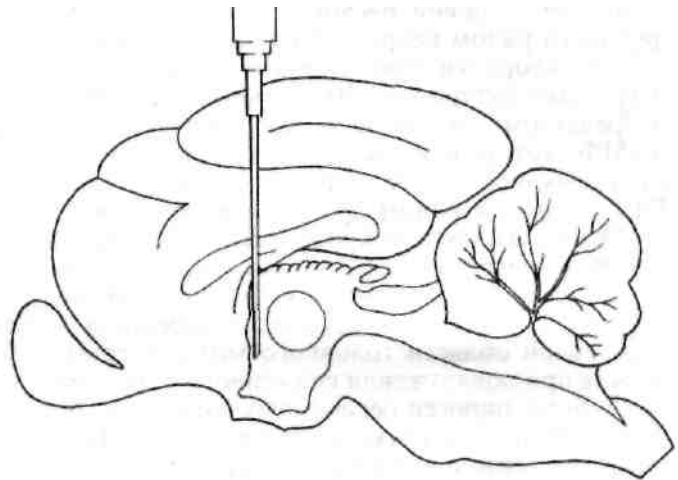


Рис. 82. А - расположение канюли для перфузии в третьем желудочке. Б - регистрация ректальной температуры у кошки. Введение 75 нг *Shigella dysenteriae* в желудочек вызывает пирексию, которая снижается внутривенным введением парацетамола. Перфузат из третьего желудочка собран до (I) и после (II) введения *Shigella*, а также после введения парацетамола (III). В-сокращения полосок дна желудка крыс свидетельствуют о простагландиновой активности перфузатов третьего желудочка [Feldberg W., Gupta K.P.-J. *Physiol.*, 1973, 228, 41-53].

интерлейкин-1 вызывает лихорадку в отличие от ПГЕ₂. Недавно обнаружено, что салицилат натрия, препарат, подавляющий простагландинсинтезу, уменьшает лихорадку, вызванную пирогеном или внутримозговой инъекцией ПГЕ₁.

Становится ясным, что ПГЕ₂ не является единственным посредником между интерлейкином-1 и лихорадочной реакцией и что некоторые нестероидные препараты могут оказывать антипиретическое действие посредством иных механизмов, дополняющих подавление синтеза простагландинов. Хотя точная роль ПГЕ₁ в патогенезе лихорадки остается неясной, в настоящее время на основании экспери-

ментальных данных можно сделать заключение о том, что ПГЕ₂ играет по крайней мере частичную роль в развитии лихорадки при введении пирогена.

Известно, что во многих системах действие ПГЕ₂ опосредуется повышением внутриклеточного уровня циклического нуклеотида-аденозин-3',5'-монофосфата (цАМФ). Уровень цАМФ в спинномозговой жидкости возрастает во время лихорадки, индуцированной пирогеном, а также при введении пирогена в передний гипоталамус. Кроме того, подавление метаболизма цАМФ ингибитором фосфодиэстеразы, таким как теофиллин, усиливает пирогенную реакцию на ПГЕ₂,

и пироген. Уровни цАМФ в нейронах модулируются рядом нейротрансмиттеров, и в патогенезе лихорадки участвует контроль некоторых температурно-чувствительных нейронов посредством изменения внутриклеточного цАМФ, который в свою очередь регулируется стимулированной пирогеном продукцией ПГЕ1, а также рядом других передатчиков.

Одним из таких нейротрансмиттеров, участвующих в контроле лихорадки, является аргининвазопрессин. Интерес к взаимосвязи лихорадки и выделения аргининвазопрессина в септальной области головного мозга впервые возник при обнаружении сниженного ответа на экзогенный пироген беременных животных перед родами (или сразу же после родов). При перфузии септальной области головного мозга небеременных животных во время лихорадки, индуцированной эндотоксином, определяется подъем уровня аргининвазопрессина. Предполагается, что аргининвазопрессин играет ингибиторную роль, поскольку перфузия септальной области головного мозга аргининвазопрессинном подавляет лихорадочную реакцию на эндотоксин. У новорожденных и беременных животных наблюдается пониженная реакция на эндотоксин, но она не связана с неспособностью вырабатывать интерлейкин-1 или с незрелостью механизмов, контролирующих температуру. В действительности сниженный ответ связан с выделением аргининвазопрессина. Неизвестно, почему у беременных и новорожденных животных ограничена пирексия; неясно также, в какой степени аргининвазопрессин вовлекается в физиологическую регуляцию пироксического ответа небеременных зрелых животных. Следует отметить, что аргининвазопрессин также вызывает выделение адренкортикотропного гормона, который в свою очередь стимулирует выброс кортикостероидов надпочечниками. Кортикостероиды подавляют лихорадочные реакции на эндотоксин и обладают другими противовоспалительными эффектами (см. главу 24).

Значение лихорадки

Многие исследования вносят значительный вклад в получение новой ценной информации о процессах, в результате которых иммунные и неиммунные защитные механизмы вызывают лихорадку. Пирексия является филогенетически примитивной реакцией. Рыбы, амфибии, рептилии, птицы и млекопитающие обладают

фебрильной реактивностью в отношении бактериальной инвазии. Так, экзотермы и эндотермы развивают фебрильные реакции, и их индукция в обеих группах также вызывает образование эндогенного пирогена. Остается неясным, какое значение имеет лихорадка для выживания.

Говоря в общем, лихорадка является либо эпифеноменом активации защиты организма, либо играет специфическую роль в усилении этой защиты. Если справедливо последнее, то лихорадка может выполнять две полезные функции: 1) оказывать необходимое влияние на рост, пролиферацию или токсичность микроорганизмов; 2) повышать эффективность механизмов защиты организма.

Результаты, полученные *in vitro*, показывают, что температура, достигаемая при лихорадке, может быть летальной для ряда патогенных организмов. Некоторые пневмококки, гонококки и спирохеты разрушаются при температуре от 40 до 41 °С. В других исследованиях обнаружено, что температура в диапазоне 37-41 °С нарушает метаболическую активность некоторых микроорганизмов, подавляя их рост. Например, у *Salmonella typhimurium* при повышенной температуре снижается способность к синтезу сидерофоры (транспортные белки железа). Таким образом, лихорадка может нарушать рост или реально истреблять некоторые патогены. Однако необходимо отметить, что другие патогены, особенно вирусы, более вирулентны при температурах, достигаемых при лихорадке.

Доказательства стимуляции защитных сил организма при повышении температуры могут быть суммированы следующим образом: 1) увеличивается продукция интерферонов; 2) возрастает трансформация лимфоцитов; 3) повышается лизосомный аутолиз опухолевых клеток; 4) усиливаются функции нейтрофилов, способность к локомоции (рис. 83) и фагоцитоз, а также внутриклеточная гибель. Опять-таки следует отметить, что представленные экспериментальные данные в каждом из этих случаев не всегда согласуются между собой и, кроме того, основаны на исследованиях *in vitro*. Отражают ли эти эксперименты *in vitro* способность организма к выживанию при атаке патогенов в условиях повышенной температуры?

У экзотермов получены некоторые противоречивые данные. Контроль температуры всего тела в эксперименте у них осложняется в меньшей степени, чем у эндотермов, которые

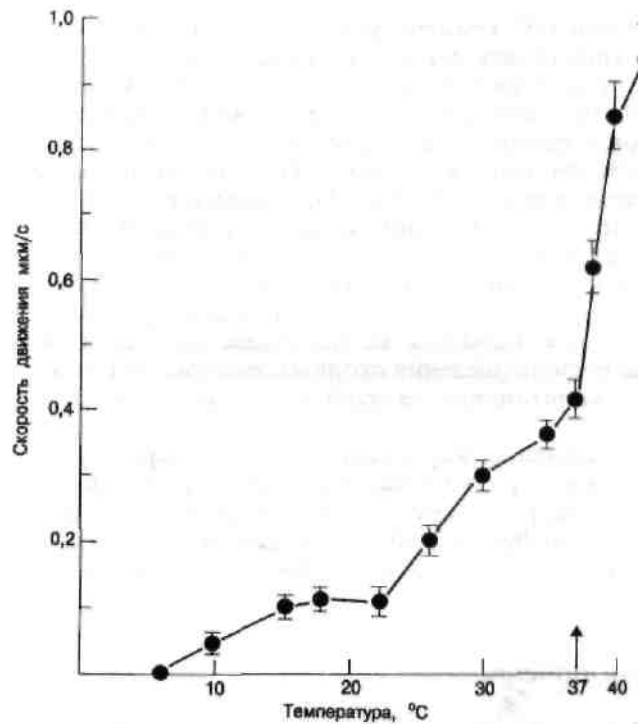


Рис. 83. Изменение скорости движения нейтрофильных лейкоцитов человека в зависимости от температуры [Nahas G.G., Tannieres M. L., Lennon J. F- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1971, 138, 350-352].

обладают рядом гомеостатических механизмов, регулирующих температуру тела с нижним пределом. На рис. 84 показано, что понижение температуры тела у рыб драматически уменьшает выживаемость при инфекции, вызванной *Aeromonas hydrophila*. Сходные результаты получены у игуан. У млекопитающих результаты экспериментально вызванной гипер- или гипотермии с целью оценки выживаемости

при инфекциях весьма противоречивы: в одних исследованиях отмечается снижение выживаемости при уменьшении температуры, в других при увеличении. Отчасти это может объясняться тем, что физиологическое функционирование млекопитающих настроено на работу в нижних температурных пределах, а оценка выживаемости представляет собой достаточно грубый метод определения влияния

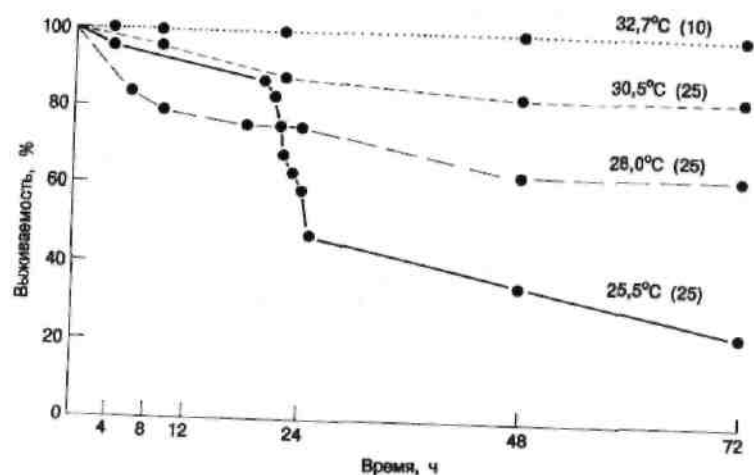


Рис. 84. Выживаемость золотых рыбок, инфицированных *Aeromonas hydrophila* и содержавшихся при температуре 25,5; 28 и 30,5 °C. Десяти рыбкам была обеспечена поведенческая терморегуляция и выбор средней температуры тела 32,7 °C. Количество рыбок в каждой группе указано в скобках [Covert J. B., Reynolds W. W.-Nature, 1977, 267, 43-45].

изменений температуры тела на способность осуществлять защиту от инвазии патогена.

Попытки вмешательства в лихорадку у рептилий с помощью антипиретических препаратов и оценка их последствий также дают противоречивые результаты. Пустынные игуаны, зараженные *A. hydrophila*, выживают меньше, если лихорадка снимается салицилатом натрия; если же лихорадка развивается при использовании салицилата натрия и повышении температуры окружающей среды, то уменьшения выживаемости не наблюдается. Попытки же воспроизведения сходных экспериментов на млекопитающих не дали однозначных результатов.

Изучение корреляции между выраженностью лихорадки и выживаемостью показывает, что лихорадка представляет защиту от последствий инфекции, но, как и при всех корреляциях, причинно-следственные связи не установлены.

Заключение

Лихорадка является перенастройкой нормальных терморегуляторных центров, локализуемых преимущественно в преоптической области переднего гипоталамуса, на более высокую температуру. Гомеостатические механизмы температурного контроля при лихорадке

продолжают функционировать, но в направлении восстановления именно этой высокой температуры.

Ряд иммунных и неиммунных реакций организма на инвазию чужеродными организмами или клетками приводит к образованию интерлейкина-1, эндогенного пирогена, который вызывает перенастройку терморегуляторных центров (возможно, опосредованно-через ПГЕ1 и цАМФ). Аргининвазопрессин может контролировать выраженность проявлений лихорадки в ответ на пироген. Существуют ограниченные свидетельства того, что лихорадка помогает защитным силам организма контролировать инвазию патогена.

Лейкоцитоз- это увеличение количества лейкоцитов в крови выше 10^7 мл, что является одним из общих проявлений некоторых типов инфекций и воспаления. В большинстве случаев такое увеличение связано с нейтрофильными гранулоцитами; реже наблюдается рост числа лимфоцитов; необычным является лейкоцитоз с вовлечением других клеток белой крови. Повышение количества нейтрофильных лейкоцитов, называемое также нейтрофилией, будет рассмотрено в данной главе.

Образование нейтрофилов

Нейтрофильные гранулоциты образуются в костном мозге из полипотентной стволовой клетки, обеспечивающей рост всех клеток крови и отвечающей за гемопоэз в течение всей жизни. Каждую минуту в организме человека образуется около 120 млн гранулоцитов, а также 150 млн эритроцитов и других клеток крови. Стволовые клетки, отвечающие за столь высокую продуктивность, происходят из относительно небольшого количества полипотентных стволовых клеток, закладываемых во время эмбриогенеза. Родоначальные стволовые клетки способны к самообновлению, так что популяция полипотентных клеток поддерживается на протяжении всей жизни. Эти клетки встречаются в костном мозге с частотой примерно 1 : 1000 и определяются по способности к формированию колоний в селезенках облученных мышей и крыс. Их обозначают как колониобразующие единицы селезенки (или КОЕ-с). Помимо самообновления, стволовые клетки при дифференциации образуют особые прогениторные клетки, которые необратимо коммитированы в направлении развития какого-либо из шести типов клеток крови.

Совершенно очевидно, что между дифференциацией и самообновлением поддерживается строгий баланс. Прогениторные клетки распознаются по их способности образовывать колонии соответствующих линий в полужидком агаре в присутствии особых «ростовых

факторов», или «колониестимулирующих факторов» (КСФ). Современные методы позволяют культивировать одиночную стволовую клетку, которая затем может развиваться, давая клоны потомков специфической гемопоэтической линии. Возможно, что развитие любого типа клеток крови (нейтрофилов, моноцитов, эритроцитов, тромбоцитов и т.д.) контролируется рядом ростовых факторов, действующих последовательно и ограниченных как по своему биологическому эффекту, так и по типу клеточных мишеней, на которые они влияют. Колониестимулирующие факторы исследованы главным образом *in vitro*, и их точное отношение к событиям *in vivo* неясно. Тем не менее недавно показано, что длительная инфузия рекомбинантного человеческого колониестимулирующего фактора активирует гемопоэз. Непрямым свидетельством участия КСФ в регуляции нейтрофилов *in vivo* является корреляция колебаний уровня КСФ в моче с изменением количества нейтрофилов у больных циклической нейтропенией.

Факторы, влияющие на развитие нейтрофилов

Все КСФ, ответственные за развитие клеток крови, относятся к гликопротеинам, активным в концентрациях 10^{-12} - 10^{-10} М. Они не просто запускают формирование колоний в агаре, но и должны длительное время присутствовать в среде как для поддержания пролиферации коммитированных прогениторных клеток, так и для их выживаемости. Ранние прогениторные клетки нейтрофильной линии способны развиваться либо в гранулоциты, либо в макрофаги. Известны четыре КСФ, участвующие в контроле развития гранулоцитов и макрофагов у мышей, и четыре-пять у человека (табл. 23). Эти факторы многократно переименовывались, в том числе в связи с их белковыми характеристиками, что обусловило определенные трудности при разработке номенклатуры, от которой требовались в равной мере точная описательность и неамбициозность. Используемые здесь термины предложены Metcalf в

Таблица 23. Известные колониестимулирующие факторы гранулоцитов и макрофагов

Вид	Наименование	Альтернативная номенклатура	M(г)	Источник очищенного КСФ	Клетки, образующиеся при КСФ-стимуляции	Очищен	Клонирование кДНК
Человек	ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный КСФ)	КСФ- α NIF-T	19 000	Лейкемические клетки и линии Т-клеток (к.с.) ¹	Гранулоциты и макрофаги	Да	Да
	Г-КСФ	КСФ- β	19 000	Клеточная линия рака ротовой полости (к.с.) ¹	Гранулоциты (действует на промиелоциты и миелоциты)	Да	Да
	М-КСФ	—	45 000	Моча	Гранулоциты и макрофаги (непрямое действие через аксессуарные клетки)	Да	Да
	Мульти-КСФ (ИЛ-3)	—	14 000	Линия Т-клеток гиббона (к.с.) ¹	Гранулоциты, макрофаги, эритроидные клетки, полипотентные колонии	Нет	Нет
Мыши	ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный КСФ)	МГИ-МГ	23 000	Легкое мышей (к.с.) ¹	Гранулоциты и макрофаги	Да	Да
	Г-КСФ (гранулоцитарный КСФ)	МГИ-ГС	25 000	—	Гранулоциты	Да	Нет
	М-КСФ (макрофагальный КСФ)	КСФ-1	40 000–70 000	Лейкемические клетки (к.с.) ¹	Макрофаги	Да	Да
	Мульти-КСФ (мультипотентный КСФ)	МГИ-МС ИЛ-3, РФТК, БОА, ФСПК	23 000–30 000	Лейкемические клетки (к.с.) ¹ ; Т-лимфоциты, примированные митогеном или антигеном	Гранулоциты, макрофаги, эритроидные клетки, эозинофилы, мегакариоциты, тучные и стволовые клетки	Да	Да

¹(к.с.)-источником является кондиционированная среда указанных клеток.

РФТК - ростовой фактор тучных клеток; ИЛ-3-интерлейкин-3; БОА - бурстобразующая активность; ФСПК-фактор, стимулирующий Р-клетки; МГИ-МС- макрофаго-гранулоцитарный индуктор (специфический для макрофагов); МГИ-ГС-макрофаго-гранулоцитарный индуктор (специфический для макрофагов и гранулоцитов); МГИ-МС-макрофаго-гранулоцитарный индуктор (специфический для гранулоцитов); КСФ-1-колониестимулирующий фактор I. [По Metcalf (1986); см. также Clark, Kamen (1987) и Sieff (1987).]

1986 г. Так, ГМ-КСФ обозначает фактор, стимулирующий образование гранулоцитов и макрофагов; Г-КСФ стимулирует преимущественно развитие гранулоцитов, а М-КСФ-развитие макрофагов. Мульти-КСФ обозначается фактор, стимулирующий не только гранулоциты и макрофаги, но и эритроидные клетки, эозинофилы, тучные клетки, мегакариоциты и стволовые клетки.

Активность ряда факторов перекрывается, и, как уже указывалось, по крайней мере два, а возможно, и три фактора имеют важное значение для полного развития клеточной линии. Так, факторы I класса, такие как мульти-КСФ и ГМ-КСФ, действуют на полипотентные стволовые клетки и незрелые прогениторные клетки. Эти факторы неспецифичны по отношению к какой-либо конкретной клеточной линии и необходимы при дифференциации. Факторы II класса, Г-КСФ и М-КСФ, влияют на дифференциацию более зрелых прогенитор-

ных клеток и имеют важное значение для пролиферации и выживаемости этих клеток.

КСФ не обладают какой-либо гомологией последовательности с другими ростовыми факторами (фактор роста эпидермиса, ростовой фактор из тромбоцитов или интерлейкин-2) или с любыми другими известными белками. Не обладают они гомологией последовательности и с известными в настоящее время продуктами онкогена, хотя с-fms-протоонко-генные продукты родственны рецептору для мышиного КСФ. Из этого следует, что КСФ не происходят из одной общей молекулы-предшественника. Однако у человека гены рецепторов ГМ-КСФ и М-КСФ физически связаны с 5-й хромосомой. Поэтому вполне вероятно, что, хотя разные КСФ весьма различаются по полипептидной структуре, они обладают генетическими признаками, позволяющими координировать их на уровне активации транскрипции, которая параллельна действию КСФ при

стимуляции пролиферации макрофагов и гранулоцитов.

Все нормальные ткани способны синтезировать один или более КСФ, хотя и в минимальных количествах. По-видимому, синтез четырех главных КСФ *in vivo* осуществляется в основном фибробластами, эндотелиальными клетками, лимфоцитами и макрофагами-клетками, широко распространенными во всех органах, которые, вероятно, первыми контактируют с внедрившимися микроорганизмами. Т-лимфоциты, стимулированные лектинами, синтезируют ГМ-КСФ и мульти-КСФ вместе с другими лимфокинами, например интерлейкином-2. Наиболее богатым источником ГМ-КСФ и Г-КСФ для экспериментальных исследований является «кондиционированная среда» культивируемых легочных тканей средней, которым вводится эндотоксин. Из 1000 мышинных легких можно получить только 5-12 мкг ГМ-КСФ и 2-4 мкг Г-КСФ. Некоторые КСФ клонированы (см. табл. 23), что в будущем обеспечит доступность больших количеств чистых КСФ.

Эффекты КСФ

КСФ действуют на клетки-мишени через специфические высокоаффинные рецепторы клеточных мембран. Каждый КСФ обладает собственным рецептором, а каждая клетка-мишень имеет несколько типов рецепторов к КСФ. Связывание КСФ с рецепторами при 0 °С происходит очень быстро и практически необратимо. При связывании одного вида рецепторов КСФ наблюдается отрицательная модуляция связывания других видов рецепторов КСФ. Влияние КСФ на клетки-мишени включает по крайней мере четыре разных, но взаимосвязанных эффекта.

1. Они прямо стимулируют клональную пролиферацию предшественников гранулоцитов и макрофагов, а также прогениторных клеток при концентрации 10^{-12} - 10^{-10} М (рис. 85). Следует отметить, что все другие известные вещества, стимулирующие пролиферацию, делают это непрямым способом, индуцируя синтез КСФ.

2. В исследованиях *in vivo* они способствуют выживаемости прогениторных и зрелых терминальных клеток.

3. Они способствуют коммитированию биопотенциальных прогениторных клеток гранулоцитов и макрофагов к ограниченному пути дифференциации (либо к формированию гра-

нулоцитов или макрофагов). Этот процесс необратим; он происходит в течение одного или двух клеточных делений и требует длительного присутствия КСФ.

4. Они способны стимулировать ряд функций зрелых конечных клеток: а) КСФ индуцируют изменения формы, адгезию и экспрессию мембранных антигенов нейтрофилов и макрофагов, а также облегчают фагоцитарную активность; б) КСФ стимулируют синтез арахидоновой кислоты, простагландина E_2 , интерлейкина-1, интерферона и активатора плазминогена, а также индуцируют продукцию перекисей; в) КСФ усиливают антитело- и комплементзависимую цитотоксичность в отношении микроорганизмов; г) ГМ-КСФ является фактором хемотаксиса нейтрофилов.

Установлены два уровня КСФ-контроля популяции гранулоцитов и макрофагов.

Базальный контроль. Базальный уровень продукции и дифференциации клеток поддерживается КСФ, которые генерируются стромальными клетками костного мозга.

Реакция на инфекцию. Эндотоксины и другие продукты микроорганизмов могут стимулировать образование КСФ в периферических тканях, особенно при действии на моноциты. Так, при экспериментальном введении эндотоксина отмечается 1000-кратное увеличение циркулирующих КСФ, особенно ГМКСФ и Г-КСФ, а также повышение их концентрации во всех тканях. В эту реакцию вовлекается интерлейкин-1 (см. главу 15). Эффект возникает через несколько минут после введения и достигает максимума через 3-6 ч. Вероятно, при локальном введении КСФ синтезируется местно. КСФ образуется в периферических тканях и выделяется в циркуляцию, связываясь в костном мозге и селезенке (показано при изучении распределения радиоактивно меченного вещества), где он оказывает влияние на пролиферацию гранулоцитов и макрофагов. Местно КСФ может усиливать функциональную активность клеток в месте инфекции.

Упрощенная версия базального контроля КСФ продукции лейкоцитов, а также действие инфекции показаны на рис. 86.

Значение КСФ при инфекции установлено Metcalf (1987). Ясно, что большое значение в реакциях организма на инвазию микроорганизмов имеют Т- и В-клетки. Но при первичной инфекции для развития ответа лимфоцитов требуется от 4 до 7 дней, что недостаточно для борьбы с высокопатогенными, быстро делящимися организмами. Давно известно, что

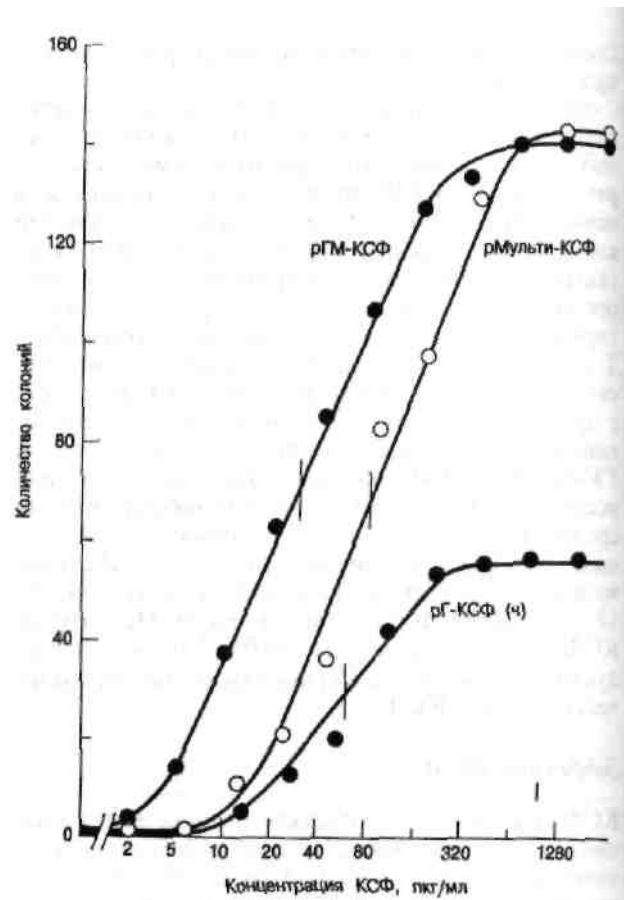


Рис. 85. Кривые доза-эффект образования мышинных грануцитомacroфагальных колоний в мягком агаре под действием рекомбинантных ГМ-КСФ, мульти-КСФ и Г-КСФ человека. (По Metcalf, 1987.)

в критическом, раннем и иммунологически неспецифическом ответе участвуют нейтрофилы и макрофаги. Вероятно, что система КСФ имеет важное значение для мобилизации и активации этих клеток.

Человеческий рекомбинантный Г-КСФ вызывает дозозависимое увеличение числа нейтрофилов у мышей (рис. 87). Аналогичный эффект наблюдается у обезьян; у них также отмечается сокращение периода восстановления нейтрофилов при миелодепрессии, вызванной циклофосфамидом. Человеческий рекомбинантный ГМ-КСФ у обезьян увеличивает количество циркулирующих лейкоцитов. В обоих случаях для получения эффектов требуется постоянная инфузия фактора. В предварительных исследованиях рекомбинантный ГМ-КСФ отменял нейтропению у больных СПИДом.

Гемопоэтические факторы потенциально терапевтически целесообразны при необходимости увеличения количества лейкоцитов у больных с миелосупрессией, а также для повыше-

ния защитных сил организма при инфекции, когда они подавлены. До сих пор не установлена их роль в лечении лейкоза.

Практически вся экспериментальная работа по изучению роли КСФ проведена *in vitro*. До сих пор неясно взаимоотношение эффектов конкретного КСФ и событий *in vivo*, хотя последовательность развития нейтрофилов давно хорошо известна. Так, первые распознаваемые предшественники нейтрофилов появляются в костном мозге, где они проходят две фазы развития. Первоначальная пролиферация и дифференциация (миелобласт-промиелоцит-миелоцит-метамиелоцит) включают шесть делений и занимают около 6 дней; поздняя фаза постмитотического созревания длится примерно 8 дней (рис. 88). Во время второй фазы клетки приобретают функциональные характеристики: способность прикрепляться к поверхности, отвечать на хемотаксины, осуществлять фагоцитоз и т.д. Ia-антигены присутствуют в ранних клетках и исчезают на стадии

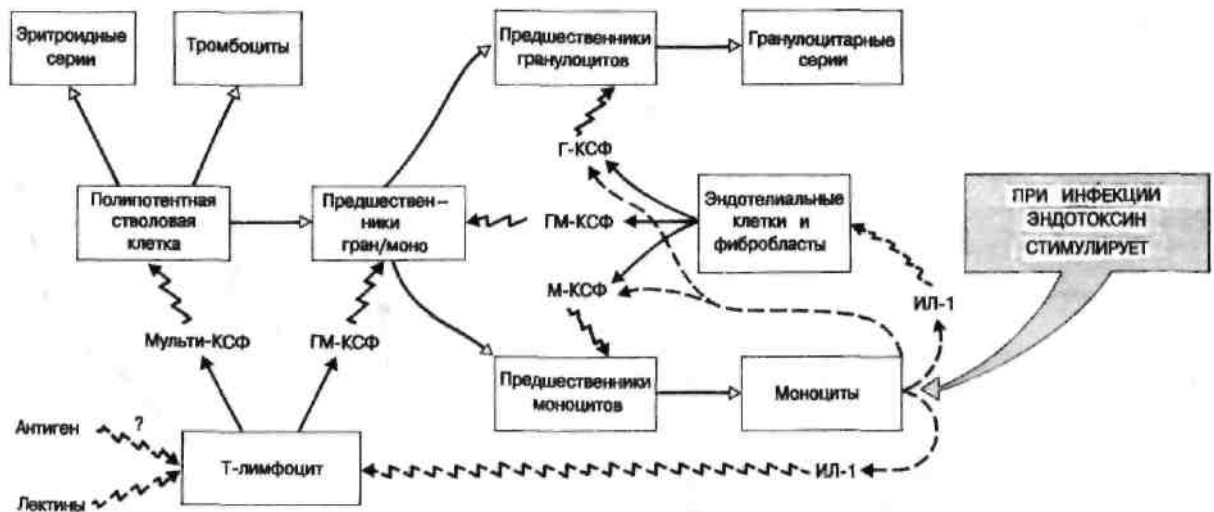


Рис. 86. Упрощенная схема участия гемопоэтических ростовых факторов в контроле образования лейкоцитов.

Действие мульти-КСФ (или интерлейкина-3) на полипотентные стволовые клетки показано у мышей, но пока не показано у человека. Другие КСФ, вероятно, образуются в низких концентрациях покоящимися стромальными клетками (эндотелиальными клетками и фибробластами). При микробной инфекции эндотоксин вызывает выделение ИЛ-1 моноцитами, что приводит к повышенному выделению ГМ-КСФ, ГКСФ и М-КСФ. Кроме того, макрофаги, стимулированные эндотоксином, образуют Г-КСФ и М-КСФ. Лектины и, возможно, антигены также стимулируют выделение Т-клеточных гемопоэтических факторов. Гран/моно - гранулоциты/моноциты; светлыми стрелками обозначено превращение; темными стрелками - образование, выделение; зигзагообразными стрелками - действие. Непрерывная линия означает базальный контрольный механизм, пунктирная - указывает на инфекцию. (По Sieff, 1987.)

промиелоцитов. Примерно 17% нейтрофилов в костном мозге находится в пролиферирующем отсеке, остальные же покоятся в отсеках для созревания и хранения, что позволяет поддерживать в течение нескольких дней поступление нейтрофилов в циркуляцию.

Получены некоторые достаточно противоречивые данные об избыточной продукции нейтрофилов в костном мозге; эти клетки гибнут вплоть до поступления «команды» на увеличение их количества.

Простагландины серии E, как и некоторые препараты лейкоцитарных интерферонов, подавляют пролиферацию колониеформирующих единиц. Синтез и выделение двух противоположно направленных типов медиаторов, а именно КСФ и ПГЕ₁ могут иметь важное значение для регуляции миелопоэза.

Предполагается, что зрелые гранулоциты по принципу обратной связи оказывают негативное влияние на гранулопоэз. В исследованиях *in vitro* зрелые клетки и(или) их продукты уменьшают образование КСФ у макрофагов и подавляют колониеобразование. Есть дан-

ные о том, что лактоферрин, входящий в состав специфических гранул, принимает участие в этой ингибиторной активности. Лактоферрин (более насыщенная железом молекула по сравнению с аполактоферрином) обладает мощным бактериостатическим эффектом. Один нейтрофил содержит 3-6 пкг лактоферрина; этого количества вполне достаточно для значительного подавления КСФ моноцитами (10^5), но недостаточно для подавления продукции КСФ, стимулированной эндотоксином (см. ниже).

Распределение нейтрофилов

Зрелые нейтрофилы могут поступать в циркуляцию или храниться в костном мозге, что обеспечивает их резервный пул, составляющий примерно 8-10 клеток (см. рис. 88). Резервный пул составляет приблизительно 50% клеток костного мозга. Нейтрофилы (около 10^{10}) ежедневно выделяются в кровоток. Подсчитано, что плотный орган с такой продукцией

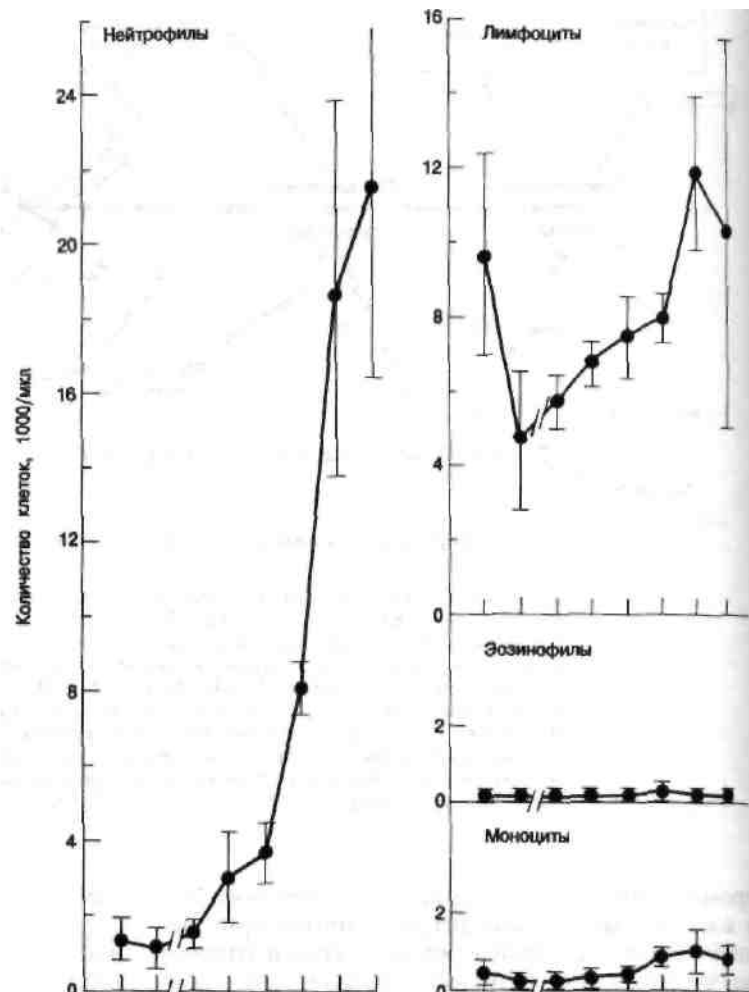


Рис. 87. Влияние рекомбинантного человеческого Г-КСФ на количество лейкоцитов в крови мышей.

Инъекции каждой дозы проводились 3 раза в день в течение 6 дней. Б-без введения; И-инъекция препарата (растворитель: сыворотка - солевой раствор). (По Metcalf, 1987.)

клеток увеличивался бы на 50-100 г в день.

В крови содержится примерно 6×10^{10} нейтрофилов, половина из которых составляет циркулирующий гранулоцитарный пул (ЦГП), а остальные - маргинированный гранулоцитарный пул (МГП). Нормальное содержание нейтрофилов в крови - примерно 3500/мкл; падение ниже уровня 500 клеток/мкл обуславливает выраженную чувствительность к инфекции.

Время полураспада нейтрофилов в циркуляции определяется при измерении кинетики клеток, меченных диизопропилфлюорофосфатом, содержащим ^{32}P (ДФ ^{32}P), ^3H -тимидином, ($^3\text{HTдн}$) радиоактивным хромом (^{51}Cr) или окисью ^{111}I . ДФ ^{32}P достаточно селектив-

но связывается с гранулоцитами после стадии миелоцитов. Собственные клетки (меченые и реинфузированные) быстро распределяются в общем циркулирующем пуле нейтрофилов; изменение радиоактивности в крови отмечается после построения экспоненциальной кривой с периодом полураспада 5,3 или 6,7 ч в разных исследованиях. С другой стороны, ^{51}Cr метит все клетки крови, поэтому необходимо отделение нейтрофилов либо перед инфузией, либо в образцах, полученных для измерения. В исследованиях с использованием ^{51}Cr отмечается продолжительность полужизни, равная 16 ч. Оба метода включают обработку нейтрофилов *in vitro*, что может быть источником ошибок.

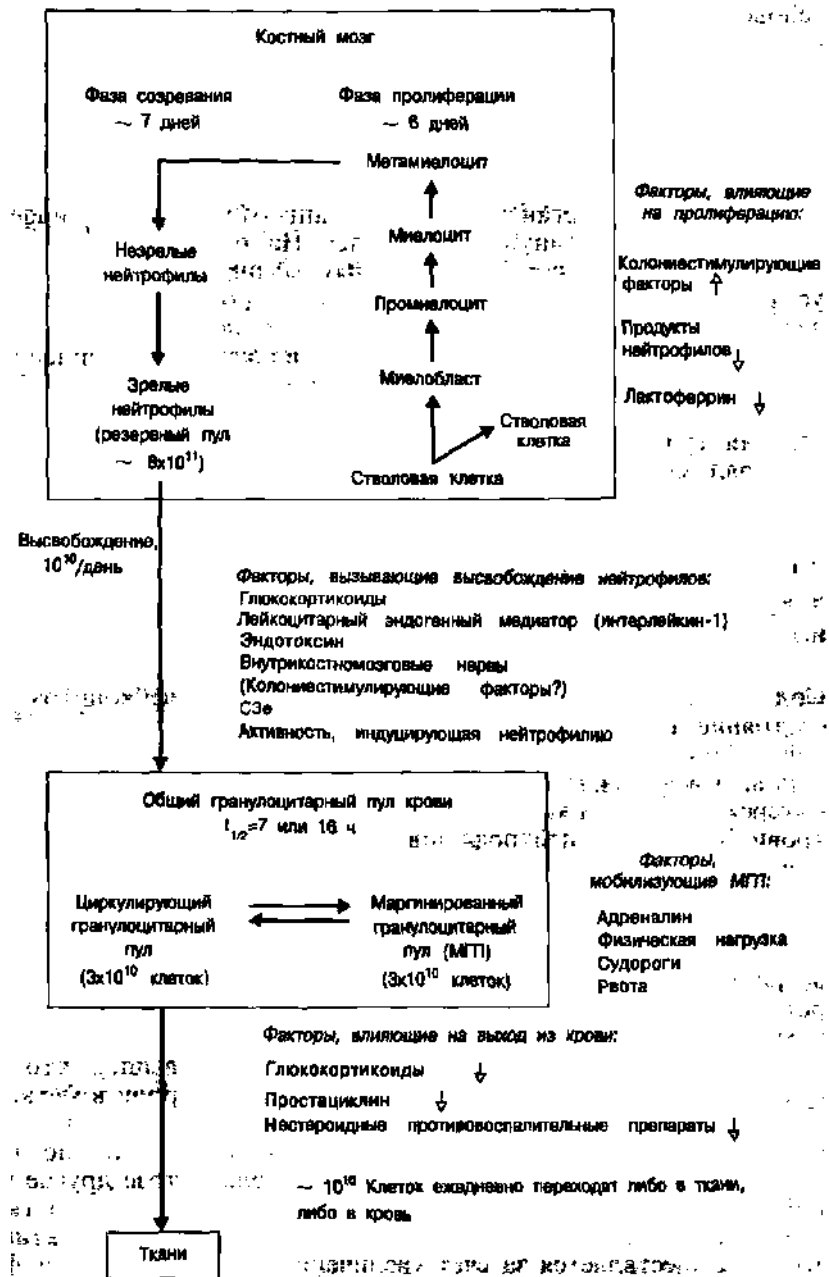


Рис. 88. Образование и распределение гранулоцитов.
Стрелки, направленные вверх, указывают на усиление реакции, а направленные вниз - на ее подавление.

В некоторых работах не исключено также определенное влияние протеаз серина, которые могут изменять функцию нейтрофилов. ДФ ⁵²P может инактивировать указанные ферменты, влияя на распределение меченых клеток. Исследования с использованием ³HTдн не требуют обработки нейтрофилов in vitro. При использовании тимидина, меченного тритием,

изотоп вводился для мечения развивающихся клеток костного мозга одному из химерных телят-близнецов. При последовательном определении внутрисосудистой выживаемости меченых нейтрофилов у второго близнеца после временного установления перекрестного кровообращения период полураспада составил 9,2-10,8 ч. В более недавнем исследовании (у

человека) период полураспада реинфузированных гранулоцитов, меченных окисью ^{111}I , составил 5,0- 1,6 ч.

Какова же окончательная судьба нейтрофилов крови? Около 10^{10} клеток исчезает из организма в течение суток. Как полагают, они мигрируют в ткани, не фиксируясь в каком-либо определенном органе; они не возвращаются в циркуляцию, покинув ее однажды. На основании исследования беспатогенных мышей установлено, что нейтрофилы покидают кровеносное русло под действием хемотаксинов, при отсутствии которых клетки гибнут в сосудистом отсеке. Согласно другому предположению, клетки гибнут в костном мозге. Окончательная судьба нейтрофилов точно пока не установлена.

Увеличение числа нейтрофилов в крови- нейтрофильный лейкоцитоз, или нейтрофилия

Содержание гранулоцитов в крови отражает состояние циркулирующего пула гранулоцитов, которое определяется балансом трех факторов: высвобождением из костного мозга, потерей в тканях и маргинацией гранулоцитов крови. Количество нейтрофилов в крови может удваиваться в течение нескольких секунд благодаря мобилизации маргинированных клеток. За счет мобилизации резервного пула костного мозга количество нейтрофилов может быстро возрасти в 10 раз. Мобилизация из маргинированного пула, которая приводит к умеренному лейкоцитозу, наблюдается при ряде состояний-при тяжелых физических нагрузках, судорогах, сильной боли, приступах рвоты.

Лейкоцитоз при инфекциях и воспалении определяется мобилизацией МГП и высвобождением из костного мозга. При продолжительной инфекции дополнительно повышается образование гранулоцитов в костном мозге, которое осуществляется за счет увеличения продукции клеток на стадии миелоцитов и более быстрого прохождения через постмитотический пул. Этому предшествует лейкоцитоз в крови, который сопровождается увеличением количества нейтрофилов в областях локального (или фокального) воспаления. Число накапливающихся локально клеток может во много раз превышать весь нормальный циркулирующий пул (увеличенное количество в крови отражает транзит клеток в эти места).

Какие же факторы участвуют в изменениях распределения гранулоцитов?

Экспериментально показано, что введение адреналина вызывает лейкоцитоз, причем количество нейтрофилов возрастает на 40-80% за счет мобилизации МГП. В этом процессе принимают участие β -адренорецепторы, поскольку инфузия пропранолола перед инъекцией адреналина подавляет лейкоцитоз. Этот эффект может частично объясняться изменениями перфузии соответствующего сосудистого русла, поскольку *in vitro* показано, что прикрепление гранулоцитов к эндотелиальным клеткам, обработанным адреналином, происходит менее легко, чем в контроле, и что данный эффект подавляется пропранололом (10^{-5} М), но не фентоламином (10^{-5} М). Однако постулированный рецептор не был при этом детально охарактеризован. Данный эффект адреналина, вероятно, служит основой нейтрофилии при физической нагрузке и других состояниях, сопровождающихся повышенным выделением катехоламинов.

Главным медиатором, ответственным за лейкоцитоз при инфекциях, по-видимому, являются КСФ. Роль микроорганизма заключается в следующем: эндотоксин грамотрицательных бактерий эффективно вызывает лейкоцитоз; так, инъекция 1 мкг/кг *Salmonella abatus-equi* приводит к 200% увеличению циркулирующих нейтрофилов через 4-6 ч после первоначальной преходящей нейтропении. (Детальное описание структуры эндотоксина дано в главе 19.) Нейтрофилия обусловлена главным образом высвобождением клеток из костного мозга. Показано, что введение эндотоксина повышает активность КСФ в сыворотке (см. выше), что свидетельствует об их ведущей роли в механизме увеличения продукции нейтрофилов.

Неясно, принимают ли участие в лейкоцитозе другие медиаторы организма, хотя такая возможность не исключается. Комплемент обычно активируется во время воспалительной реакции, а фрагмент третьего компонента-С3е-обладает лейкоцитиндуцирующей активностью; он мобилизует лейкоциты из костного мозга и вызывает 2- 3-кратное увеличение циркулирующих нейтрофилов после его введения кроликам (см. главу 19).

Лейкоцитозиндуцирующий фактор, или активность, индуцирующая нейтрофилию (АИН), которая оказывает действие *in vivo*, обнаружена в сыворотке у крыс после инъекции тифоидной вакцины, а также у людей при введении

эндотоксина. АИН отличается от колониестимулирующего фактора, а ее образование связано с нейтропенией, вызываемой другими агентами. Описан «лейкоцитарный эндогенный медиатор», образуемый воспалительными лейкоцитами, но в настоящее время его относят к интерлейкину-1 (см. главу 15). Показано, что он вызывает лейкоцитоз главным образом вследствие высвобождения нейтрофилов костного мозга. Однако в недавних исследованиях обнаружено, что этот медиатор стимулирует фибробласты к продуцированию ГМ-КСФ, что указывает на возможность непрямого действия.

Значение этих факторов, а также детали участия КСФ в лейкоцитозе при инфекциях окончательно не установлены.

Хотя роль эндогенных стероидов надпочечников в лейкоцитозе неизвестна, введение глюкокортикостероидов вызывает через 4-5 ч увеличение количества нейтрофилов в крови, которое обусловлено не только повышенным их высвобождением из костного мозга, но и уменьшенным выходом из циркуляции. Это приводит к сокращению накопления клеток в очагах воспаления. При продолжительном введении глюкокортикоидов число нейтрофилов в крови остается высоким в основном за счет второго фактора; продукция клеток в костном мозге не изменяется. В механизме влияния глюкокортикостероидов на кинетику нейтрофилов необходимо определить вклад пептидного медиатора, который подавляет фосфолипазу A_2 , изменяя тем самым образование простаноидов и арахидоната (см. главы 10, и 24). Предварительные эксперименты показали, что синтез белка необходим для проявления влияния глюкокортикостероидов на аккумуляцию нейтрофилов в очагах воспаления

у крыс, поскольку ингибиторы белкового синтеза предупреждают этот эффект стероидов. Может иметь значение и то, что один из продуктов метаболизма арахидоната-лейкотриен B_4 - является очень сильным хемотаксическим агентом, а другой - простаглицлин - обладает выраженным ингибиторным влиянием на адгезию нейтрофилов к сосудистому эндотелию. Необходимо выяснить взаимоотношения всех этих факторов.

Нестероидные противовоспалительные препараты - ацетилсалициловая кислота, фенилбутазон и индометацин (см. главу 25)-уменьшают аккумуляцию гранулоцитов в очагах воспаления, но не оказывают существенного влияния на уровень циркулирующих клеток.

Нервные механизмы воспаления дыхательных путей

П.Дж. Барнес (P. J. Barnes)

Растет количество данных, свидетельствующих об участии нервных механизмов в иммунофармакологических феноменах. Роль таких механизмов представляется наиболее важной в отношении астмы - клинического состояния особой значимости, патогенез которого до сих пор не вполне ясен. Однако общепризнано, что астма сопровождается более или менее выраженной бронхиальной гиперреактивностью (т.е. тенденцией к бронхоспазму и секреции в ответ на различные химические или физические стимулы) и что приступ астмы часто имеет двухфазное развитие (немедленная и отсроченная фазы) (рис. 89, см. также главу 23).

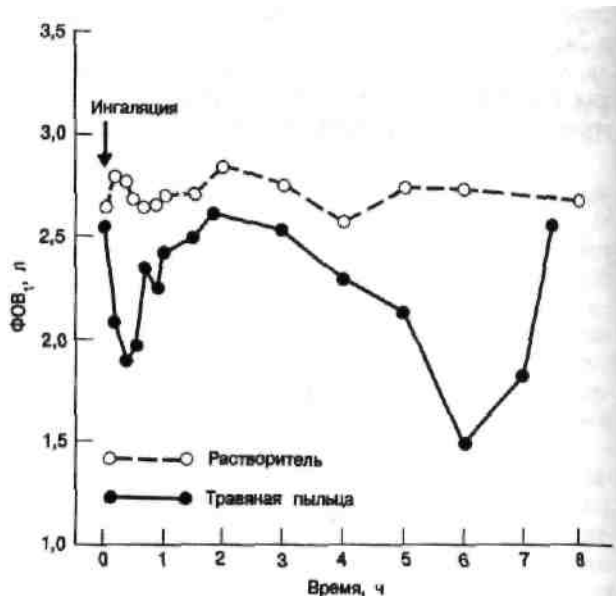
Недавно при астме выявлена сложная воспалительная реакция стенок дыхательных путей, участие которой оказывает модулирующее влияние и на которую в свою очередь оказывают влияние нервные механизмы.

Вегетативный нервный контроль дыхательных путей, видимо, более сложен, чем это представлялось раньше. При астме выявлено

нарушение функции вегетативной системы, которое, как полагают, может вносить свой вклад в патогенез заболевания. Степень участия этих нарушений, которые, возможно, предшествуют патологическим характеристикам астмы и бронхиальной гиперреактивности, продолжает обсуждаться. Существуют убедительные доказательства того, что воспаление дыхательных путей лежит в основе бронхиальной реактивности, и в настоящее время немало усилий направлено на выяснение способности этой воспалительной реакции вызывать нарушения вегетативной регуляции или рецепторов. Кроме того, нервные механизмы как таковые участвуют в воспалительном процессе (рис. 90). Исследованы некоторые возможности нарушения вегетативного контроля и (особенно интенсивно) холинергические механизмы. Совсем недавно внимание исследователей было привлечено к возможной роли неадренергических нехолинергических механизмов (НАНХ) в нормальном и патологическом контроле функции дыхательных путей.

Рис. 89. Две фазы астмы, определяемой по изменению форсированного объема выдоха в 1 с (ФОВ) после ингаляции травяной пыли [Cockcroft- Lancet, 1983, i, 253].

Первая фаза отменяется агонистами β -адренорецепторов и теофиллином, а вторая подавляется глюкокортикоидами и предупреждается хромогликатом, теофиллином или кетотифеном.



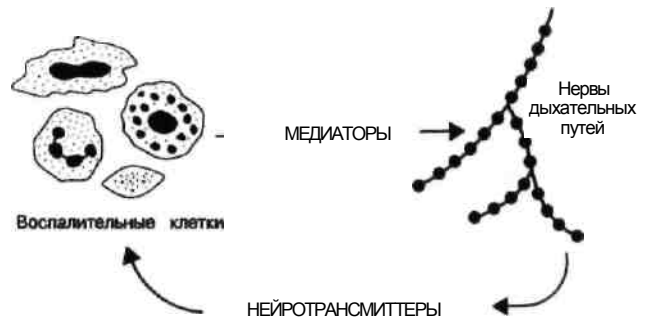


Рис. 90. Предполагаемое взаимодействие медиаторов воспаления и вегетативной нервной системы дыхательных путей.

Афферентные рецепторы

Медиаторы воспаления могут стимулировать афферентные рецепторы дыхательных путей или, возможно, внелегочных структур. Установлено несколько типов афферентных рецепторов, причем к заболеваниям дыхательных путей более других имеют отношение миелинизированные «ирритантные» рецепторы и немиелинизированные окончания С-волокон, которые локализованы в эпителии дыхательных путей. Они могут стимулироваться медиаторами, что приводит к возникновению бронхо-

спастического рефлекса. Возможна и некоторая избирательность каждого афферентного рецептора к различным медиаторам. Так, гистамин активирует преимущественно ирритантные рецепторы, а брадикинин и простагландины E_2 и I_2 селективно стимулируют окончания С-волокон. Стимуляция окончаний С-волокон может обусловить не только возникновение холинергического рефлекторного бронхоспазма; она способна привести к бронхоконстрикции посредством активации аксональных или локальных рефлексов с выделением сенсорных нейропептидов.

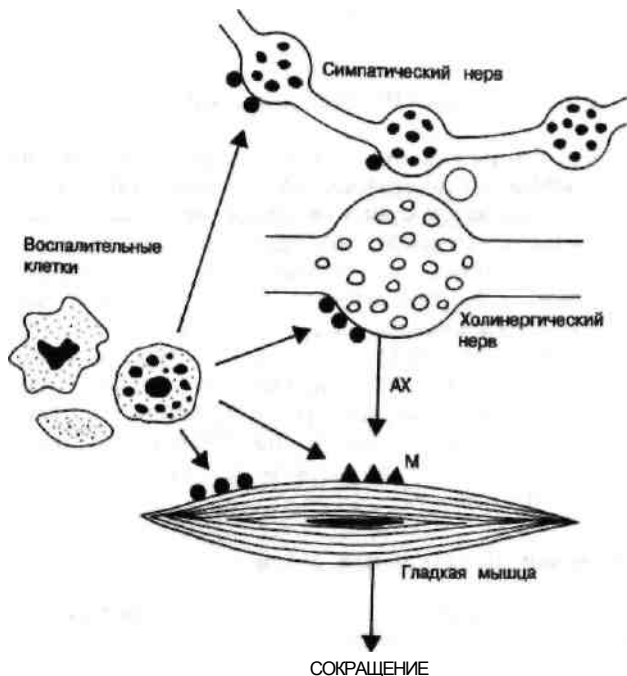
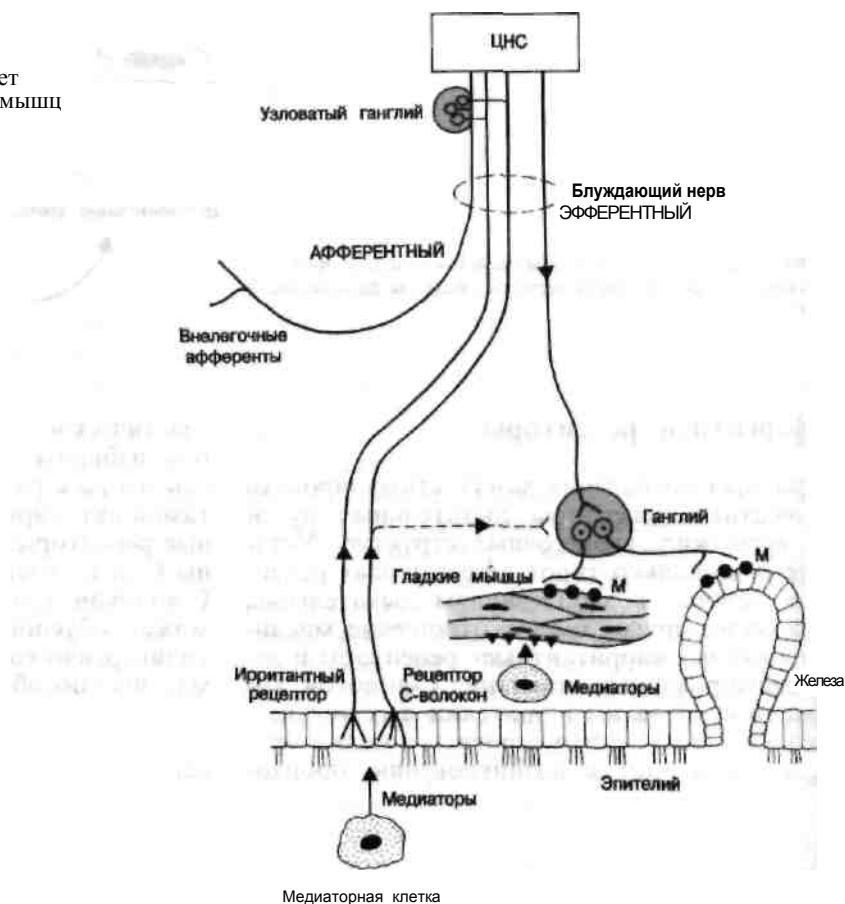


Рис. 91. Возможные взаимодействия медиаторов воспаления и холинергической нервной системы дыхательных путей.

Медиаторы могут оказывать пресинаптическое действие на холинергические нервы, способны подавлять тормозные симпатические эффекты или влиять на мускариновые рецепторы гладких мышц (М). Не исключено и постсинаптическое действие в результате активации медиаторных рецепторов гладких мышц. Кружки - рецепторы к медиаторам, треугольники - мускариновые рецепторы.

Рис. 92. Холинергическая иннервация дыхательных путей.

Выделяющийся ацетилхолин активирует мускариновые рецепторы (M) гладких мышц и желез дыхательных путей.



Холинергические механизмы

Имеется ряд данных, свидетельствующих об усилении холинергических систем при астме; предполагается существование нескольких механизмов, посредством которых медиаторы могут усиливать холинергические реакции (рис. 91). Холинергические эфферентные волокна блуждающего нерва осуществляют в основном моторную иннервацию дыхательных путей человека. Холинергические нервы переключаются в ганглиях, расположенных в стенках дыхательных путей; на уровне ганглиев, вероятно, также возможны сложные взаимодействия (рис. 92).

Ганглии дыхательных путей

Холинергические ганглии представляют собой скопление 2-20 нейронов; у человека они располагаются в трахее и бронхах. От них отходят

короткие постгангионарные нервные волокна, ведущие к иннервируемым клеткам, которые в дыхательных путях представлены гладкими мышцами и подслизистыми железистыми клетками. Ганглии дыхательных путей человека имеют и адренергическую иннервацию, что подтверждается фактом адренергической модуляции холинергической нейротрансмиссии. Аналогично этому некоторые нейропептиды, локализуясь в ганглиях, регулируют холинергический тонус. Действительно, ганглии могут функционировать как местные интегративные центры со сложными интегрирующими функциями.

Как показывают гистологические исследования, тучные клетки обнаруживаются в тесном контакте с ганглиями, поэтому возникает предположение о модуляции нейротрансмиссии воспалительными медиаторами; однако подтверждения этой гипотезы пока не получены. У морских свинок, зараженных вирусом пара-

гриппа, развивается гиперреактивность, с трудом подавляющаяся дозой атропина, которая достаточна для угнетения холинергического тонуса и действие которой отменяется ганглиоблокатором гексаметонием. Это свидетельствует об усилении ганглионарной нейротрансдукции (вероятно, вследствие выделения медиатора) и о возможном участии нехолинергических возбуждающих механизмов. Не исключено, что афферентные нервы могут снабжать ганглии дыхательных путей, поэтому местные рефлексы могут осуществляться и без участия центральных структур.

Эфферентные пути

В нормальных дыхательных путях поддерживается определенный холинергический тонус, поскольку антагонисты холинорецепторов вызывают бронходилатацию. Тонус связан с постоянным выделением ацетилхолина терминалями двигательных нервов. Ингаляция ингибиторов холинэстеразы, например эдрофония или пиридостигмина, которые предотвращают разрушение выделившегося ацетилхолина, вызывает бронхоконстрикцию у здоровых людей. У больных астмой усиленная бронхоспастическая реакция на эдрофоний свидетельствует либо о повышении активности блуждающего нерва, либо об усилении реактивности гладких мышц в ответ на выделяемый ацетилхолин.

Логично предположить, что холинергический тонус при астме повышается. Как уже отмечалось выше, повышение тонуса может происходить в результате стимуляции афферентных рецепторов, что ведет к рефлекторной холинергической бронхоконстрикции. Кроме того, возможно облегчение проведения в эфферентных холинергических путях, увеличение количества холинорецепторов или повышение эффективности сопряжения в холинорецепторе.

Для изучения влияния медиаторов воспаления на холинергическую передачу проведено немного исследований, что отчасти объясняется трудностями определения ацетилхолина, выделяемого холинергическими нервами дыхательных путей.

У собак серотонин и аналог тромбосана облегчают выделение ацетилхолина, усиливая бронхоспастический эффект стимуляции холинергических нервов. Существование подобного механизма облегчения у человека пока не установлено.

Холинергические рецепторы

У больных астмой наблюдается повышенная бронхоспастическая реакция на холинергические агонисты, что свидетельствует о повышенной холинергической чувствительности. Возможно, что медиаторы усиливают холинергические эффекты на рецепторном уровне, за счет увеличения плотности и аффинитета мускариновых рецепторов или посредством повышения эффективности связи лиганд-рецептор. Повышение реактивности не подтверждается холинергическими агонистами, а дыхательные пути гиперреактивны ко многим другим неродственным спазмогенам (см. выше). Это означает, что дефект специфических холинергических рецепторов не является наиболее вероятным объяснением бронхиальной гиперреактивности. Простагландин D₂ усиливает бронхоспастический эффект метахолина; однако аналогичное усиление определяется и в отношении гистамина, что свидетельствует о пострецепторном механизме. Холинергические агонисты облегчают выделение медиаторов сенситизированными легкими человека, что предполагает прямое действие холинергических нервов на тучные клетки.

Адренергические механизмы

При астме описаны разнообразные нарушения адренергической иннервации, но не определена их вторичность по отношению к воспалительным процессам. Данные о прямой симпатической иннервации гладких мышц дыхательных путей человека отсутствуют, однако известно, что адренергические нервы могут модулировать холинергическую передачу (рис. 93; см. также рис. 91). Многие медиаторы оказывают тормозящее действие на адренергические нервы через пресинаптические рецепторы, ослабляя таким образом ингибиторный эффект адренергических нервов и, в конце концов, повышая холинергический тонус.

Циркулирующие катехоламины

У больных астмой эндогенный адреналин играет важную роль в защите от бронхоконстрикторных влияний. Существуют данные о нарушении секреции адреналина при астме и неспособности увеличения адреналина во время бронхоспазма. Однако природа этого дефекта до сих пор не определена.

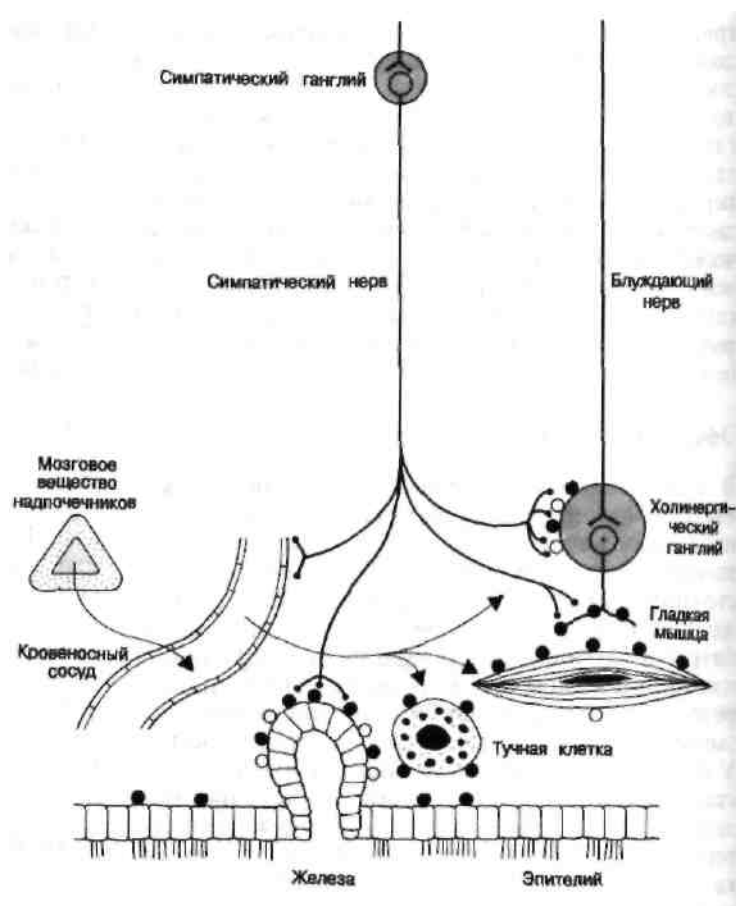


Рис. 93. Адренергический контроль дыхательных путей.

Норадреналин выделяется симпатическими нервами, а адреналин-мозговым веществом надпочечников. Катехоламины действуют на β -адренорецепторы (темные кружки) и α -адренорецепторы (светлые кружки) клеточных мишеней.

***B*-Адренорецепторы**

B-Адренорецепторы располагаются на многих клетках дыхательных путей, в том числе на тучных клетках (см. рис. 93). B_2 -Агонисты являются сильными стимуляторами тучных клеток, причем представлены косвенные доказательства тонического ингибиторного действия адреналина на выделение медиаторов тучных клеток. Многочисленные исследования посвящены изучению нарушений функций β -рецепторов при астме. Szentivanyi предположил, что дефект β -рецепторов лежит в основе астмы и атопии, однако это кажется наименее вероятным, поскольку β -блокаторы не оказывают какого-либо влияния на функцию дыхательных путей или на их реактивность у здоровых людей. По поводу возможного существования дефектов функции β -рецепторов, которые при астме вторичны, до сих пор нет какой-либо определенности; проведенные исследования дают противоречивые результаты. Оценка эффектов адре-

нергической терапии показывает, что какой-либо генерализованный дефект функции β -рецепторов является или небольшим, или не имеющим важного значения.

На модели астмы у морских свинок наблюдается уменьшение плотности легочных β -рецепторов; но, поскольку это уменьшение не сопровождается каким-либо нарушением стимуляции аденилатциклазы изопреналином, оно вряд ли может иметь функциональное значение. У морских свинок, вакцинированных *Haemophilus influenzae*, отмечается снижение β -реактивности дыхательных путей, которое сопровождается уменьшением количества *B*-адренорецепторов в легких и дыхательных путях. Неясно, связано ли это с выделением медиаторов; однако не исключена возможность, что в некоторых случаях воспалительные медиаторы уменьшают количество β -адренорецепторов или процессы связывания. Радикалы кислорода, выделяемые альвеолярными макрофагами, уменьшают β -рецепторные от-

веты дыхательных путей морских свинок, а фактор активации тромбоцитов снижает плотность В-рецепторов на мембранах клеток головного мозга. Подавление фосфолипазы А₂ кортикостероидами повышает экспрессию В-рецепторов; ввиду этого не исключено, что активация ФЛА₂, ведущая к образованию продуктов циклооксигеназы или липоксигеназы, может в свою очередь обусловить угнетение функции Р-рецепторов. Взаимосвязь медиаторов воспаления и функций Р-рецепторов требует дальнейшего изучения.

α-Адренорецепторы

Бронхосуживающие α-адренорецепторы описаны у многих видов, в том числе у человека. По имеющимся данным, при астме могут быть усилены α-адренергические реакции. Дыхательные пути, которые в нормальных условиях *in vitro* не сокращаются под действием α-агонистов, приобретают эту способность при астме, что предполагает «демаскировку» рецепторов при заболевании дыхательных путей. В дыхательных путях собак также не выявляется α-адренергического сокращения, однако в присутствии гистамина или серотонина α-агонисты вызывают заметный сократительный эффект (т.е. воспалительные медиаторы могут «включать» адренергические реакции). Это не связано с изменениями α-адренорецепторов, что установлено при измерении связывания, поэтому предполагаются пострецепторные феномены. При экспериментальной бронхиальной астме у морских свинок отмечается заметное увеличение легочных α-адренорецепторов, возможно, вследствие действия воспалительных медиаторов, поскольку аналогичные изменения плотности α-рецепторов обнаруживаются после введения гистамина.

Кажется вполне возможным, что воспаление усиливает α-адренергические реакции, а повышенная реактивность вносит свой вклад в бронхоспазм при астме. α-Агонисты действительно вызывают бронхоспазм у больных астмой (в отличие от здоровых людей) даже в отсутствие блокады р-адренорецепторов; это может быть отражением неспецифической гиперреактивности. α-Антагонисты, тимоксамин и фентоламин, расширяют бронхи и защищают их от некоторых провоцирующих агентов. Однако эти эффекты необязательно связаны с α-адренорецепторным антагонизмом, поскольку лекарственные препараты обладают и другими фармакологическими эффектами,

например антигистаминной активностью. Специфический и селективный α₁-блокатор празозин не обладает бронхорасширяющим действием и не влияет на бронхоспазм, вызванный гистамином, но имеет протективный эффект при бронхоспазме, вызванном физической нагрузкой. Однако последнее действие может быть связано с изменением кровотока в бронхах (предупреждение охлаждения дыхательных путей), а не с действием на гладкие мышцы дыхательных путей. Хотя роль α-адренорецепторов в патогенезе астмы остается неопределенной, она не является решающей, и трудно объяснить, каким образом активируются α-адренорецепторы, поскольку прямая адренергическая иннервация отсутствует, а циркулирующие катехоламины обладают бронхорасширяющим действием.

Неадренергические нехолинергические механизмы

Кроме классических холинергических и адренергических нервных путей, регуляция тонуса бронхов и секреции может осуществляться (по недавно полученным данным), НАНХ нервами дыхательных путей. Хотя нейротрансмиттеры этой системы окончательно не определены, растет количество данных в пользу возможного участия нейропептидов. Многие нейропептиды в настоящее время идентифицированы в дыхательных путях человека, хотя их значение в физиологии и при патологии до сих пор не определено (отчасти ввиду недостаточной доступности специфических антагонистов). Кажется вполне вероятным участие некоторых нейропептидов в воспалительных реакциях дыхательных путей.

Неадренергические ингибиторные нервы

Неадренергическая бронходилатация наблюдается в дыхательных путях человека *in vitro*, и, поскольку это служит свидетельством существования единственного тормозящего пути (при отсутствии симпатической иннервации), данный факт вызвал большой интерес. Возможно, что дефект данного нервного пути вносит вклад в бронхиальную гиперреактивность. Хотя первоначально предполагалось, что нейротрансмиттером может быть пурин, например аденозин или АТФ, доказательств этого пока нет. Более вероятно, что нейротрансмиттером служит вазоактивный интестинальный пептид

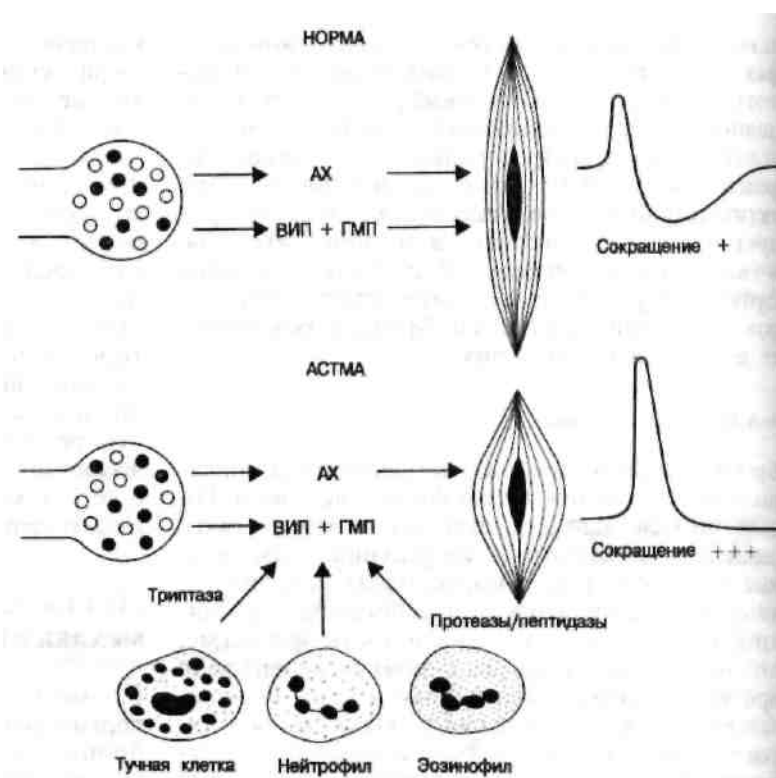


Рис. 94. Предполагаемое нарушение ВИП-ергического контроля при астме.

Вазоактивный интестинальный пептид (**ВИП**) и родственный ему гистидинметионин-пептид (**ГМП**) могут разрушаться под действием ферментов, выделяемых клетками воспаления, что ведет к усилению холинергических сократительных эффектов.

(ВИП), который является нейромедиатором в кишечнике.

ВИП

В дыхательных путях человека **ВИП** располагается в двигательных нервах, которыми снабжены гладкие мышцы дыхательных путей, сосуды бронхов и железы подслизистого слоя. **ВИП** и родственные ему пептиды (гистидинметионинпептид- ГМП) являются мощными релаксантами бронхов человека (почти в 50 раз сильнее изопреналина; хотя возможно, что более сильные эндогенные бронходилататоры еще не описаны), которые вызывают неадренергическое расслабление. В эксперименте на животных показано, что **ВИП** выделяется при стимуляции неадренергических нервов, а антитела к **ВИП** и развитие толерантности к **ВИП** вызывают снижение эффекта. Иннервация **ВИП** наблюдается главным образом в крупных дыхательных путях, что согласуется с отсутствием неадренергических ингибиторных эффектов и реакции на **ВИП** в мелких дыхательных путях, в которых, по данным радиоавтографии, отсутствуют и рецепторы к **ВИП**.

ВИП и **ГМП**, вероятно, сосуществуют с ацетилхолином в нервах дыхательных путей и имеют функциональное отношение к холинергическому контролю. **ВИП** противодействует бронхоконстрикторному эффекту ацетилхолина и служит тормозом для холинергических нервов. При астме клетки воспаления в дыхательных путях выделяют ряд ферментов (протеаз и пептидаз), которые вызывают быструю деградацию **ВИП** и **ГМП** (рис. 94). Так, тучные клетки человеческих легких выделяют триптазу, инактивирующую **ВИП**. Это значит, что модулирующее влияние **ВИП** на активность холинергических нервов снижается, что приводит к усилению бронхоконстрикции (см. рис. 94).

Сенсорные нейропептиды

Вещество Р (**ВР**) локализуется в немиелинизированных сенсорных нервах дыхательных путей некоторых видов, в том числе у человека.

ВР оказывает влияние на функции дыхательных путей, вызывая сокращение гладких мышц, усиливая секрецию слизи, повышая

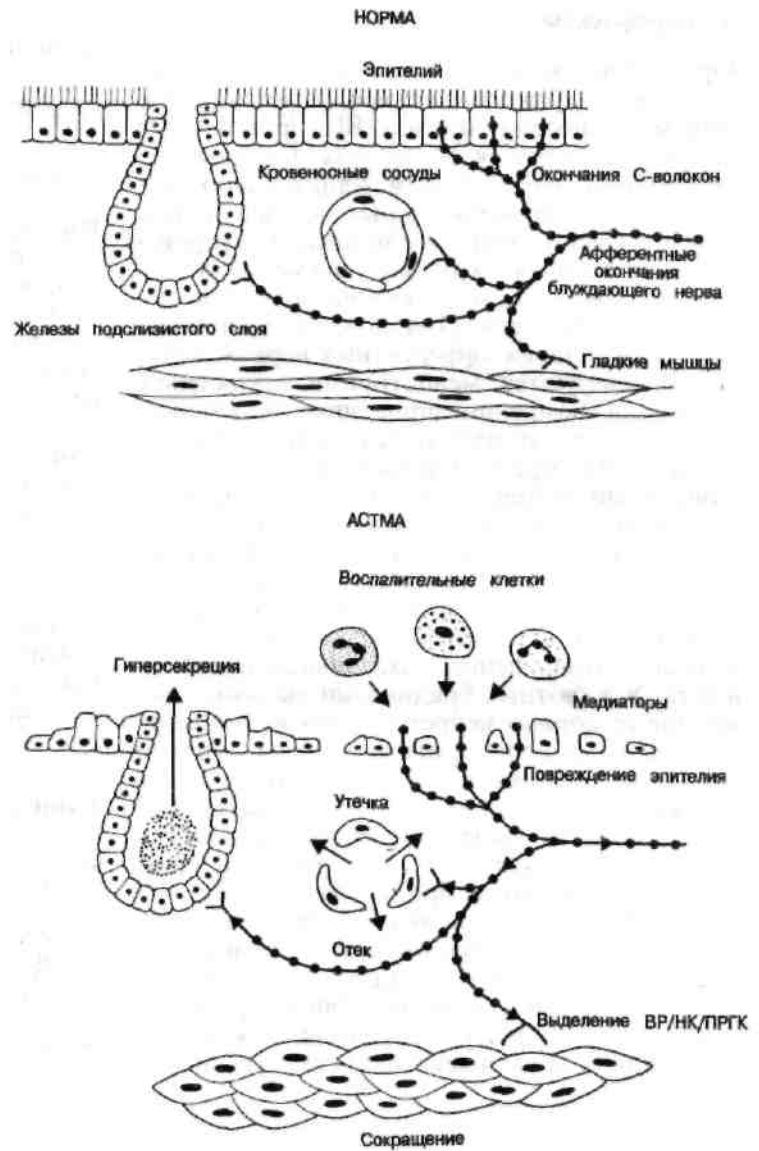


Рис. 95. Аксон-рефлекс при астме.

В результате активации обнаженных окончаний Сенсорных нервов могут выделяться сенсорные нейропептиды, такие как вещество Р (ВР), нейрокинины (НК) и пептид, родственник по гену с кальцитонином (ПРГК), которые и вызывают астматическую патологию.

проницаемость небольших сосудов и экссудацию плазмы. По крайней мере в коже ВП способствует высвобождению продуктов тучных клеток и может быть фактором хемотаксиса клеток воспаления. Все это свидетельствует о возможном участии ВП в патофизиологии астмы, а также о нейрогенной природе некоторых воспалительных изменений дыхательных путей.

Недавно из дыхательных путей млекопитающих были выделены другие тахикинины (ВП-подобные пептиды), действующие на рецепто-

ры, отличные от рецепторов для ВП. Один из них-нейрокинин А-является гораздо более сильным спазмогеном дыхательных путей человека, чем ВП. Новый пептид, обнаруженный при альтернативном тканевом процессинге гена кальцитонина и названный пептидом, связанным с геном кальцитонина (ПСГК), выявлен в сенсорных нервах дыхательных путей, причем он локализуется вместе с ВП. ПСГК является очень сильным бронхоконстриктором *in vitro*, а также мощным вазодилататором.

Аксон-рефлексы

Образование волдырей и покраснение кожи в ответ на повреждение тканей является нейрогенным процессом, причем ВП принимает в нем участие через аксон-рефлекс. Сходные аксон-рефлексы найдены в кишечнике; вероятно, они будут обнаружены и в дыхательных путях, которые имеют общее эмбриональное происхождение с кишечником. При астме, даже при относительно легком ее течении, выявлено повреждение эпителия. При повреждении обнажаются окончания афферентных нервов, которые активируются медиаторами воспаления. Окончания немиелинизированных С-волокон избирательно активируются брадикинином, медиатором, образующимся из высокомолекулярного кининогена в плазме под действием ферментов, выделяющихся клетками воспаления (в том числе тучными клетками). Брадикинин-сильный бронхоконстриктор при астме, однако он не действует на нормальные дыхательные пути, а *in vitro* вызывает лишь незначительные сокращения дыхательных путей человека. У животных брадикинин вызывает выделение сенсорных нейропептидов из немиелинизированных нервов; именно таким образом при астме брадикинин может стимулировать обнаженные окончания нервов дыхательных путей, вызывая выделение сенсорных нейропептидов в результате аксон-рефлекса (рис. 95). Это приводит к бронхоспазму, секреции слизи, экссудации плазмы и отеку бронхов. Возможно, что местные механизмы или аксон-рефлексы вносят свой вклад в воспаление дыхательных путей при астме. Ввиду эффективной блокады бронхоспастических эффектов брадикинина хромогликатом и недохромилом

можно предположить, что защитный эффект данной группы препаратов связан с действием на аксон-рефлекс через подавление выделения сенсорных нейропептидов.

Заключение

Растет число данных, свидетельствующих о влиянии медиаторов воспаления на вегетативный нервный контроль дыхательных путей при астме. Они могут проявляться на нескольких уровнях: на уровне активации афферентных рецепторов, выделения нейротрансмиттеров, рецепторов вегетативной нервной системы и их сопряжения с эффекторными механизмами. Пока получено мало информации о значимости этих механизмов в физиологии дыхательных путей человека, а также при астме. Кроме того, нервные механизмы могут влиять на выделение медиаторов и воспаление. Секреция тучных клеток модулируется факторами вегетативной нервной системы и нейропептидами, а нейрогенное воспаление через аксон-рефлекс или ганглионарный рефлекс может вносить свой вклад в патогенез астмы и бронхиальной гиперреактивности.

Часть 4
Влияние лекарственных
препаратов на воспаление и
иммунный ответ

22 Экспериментальные модели для отбора лекарственных препаратов, влияющих на реакции воспаления и гиперсенситивности

А. Д. Седжвик, Д. А. Виллоубай (A. D. Sedgwick, D. A. Willoughby)

При поиске и разработке новых лекарственных средств в настоящее время трудно обойтись без экспериментальных моделей. Это справедливо также для фармакологии воспаления и гиперсенситивности. Воспаление является сложным, многофакторным процессом, в котором принимают участие как микроциркуляция, так и многие факторы, вовлекающиеся в микроциркуляцию. Большое количество химических медиаторов вовлекается в контроль воспаления, но точные механизмы их действия остаются неясными. Вероятно, когда-нибудь мы придем к более глубокому пониманию воспалительных процессов и получим возможность продвигаться вперед, используя эксперименты *in vitro*, но пока мы еще далеки от такого уровня знаний.

Слово «модель» может иметь несколько значений. Во-первых, модель может быть точной копией, изготовленной или в натуральную величину, или в уменьшенном масштабе. Альтернативно модель может представлять собой упрощенную систему, используемую для изучения сложных процессов. Животные модели относятся к последнему случаю. Иммунофармакологи нуждаются в упрощенной системе *in vivo* для исследования терапевтических средств.

Идеальная животная модель должна отвечать нескольким основным требованиям.

1. Модель должна обеспечивать детальное исследование и количественное определение тех или иных параметров. Для воспаления весьма важно, чтобы клинические наблюдения (отек, накопление клеток, боль и жар) коррелировали с биохимическими измерениями, например с концентрациями химических медиаторов.

2. Модель должна быть воспроизводимой и обеспечивать выполнение достаточного количества экспериментов для статистического анализа.

3. Система должна обеспечивать определение небольших количеств веществ, синтезируемых биохимиками.

На практике экспериментаторы используют набор различных животных моделей для выяснения тех или иных специфических вопросов.

Сделав заключение о неадекватности моделей воспаления *in vitro*, читатель должен иметь в виду, что в настоящее время не существует моделей, полностью соответствующих воспалительным заболеваниям человека. Сегодня мы не располагаем адекватными моделями хронического воспаления и все, чего мы можем достигнуть с помощью набора доступных тестов, - это предопределить и оценить активность новых соединений, но не их побочных эффектов. Животные модели заболевания у лабораторных животных или других видов не могут заменить клинические исследования.

Классификации воспалительных реакций

Поскольку воспалительная реакция является слишком сложным процессом, было бы целесообразно разделить ее на несколько типов. На рис. 96 представлена простая классификация воспаления. Разделение на острое и хроническое воспаление имеет важное значение при разработке или интерпретации животных моделей. Для гистолога острое воспаление определяется наличием полиморфно-ядерных лейкоцитов (см. главу 3). Хроническое воспаление, напротив, характеризуется наличием мононуклеарных клеток (макрофагов и лимфоцитов) (см. главы 6 и 7). Таким образом, для иммунофармаколога желательно иметь животные модели, позволяющие регистрировать лекарственные эффекты в отдельных клеточных популяциях.

Воспаление, которое в своих внешних проявлениях всегда одинаково, может быть результатом активации многих различных химических медиаторных систем (см. часть 2). Классификация должна охватывать разные типы инициации. С этой целью используются два типа воспаления: иммунный и неиммунный.

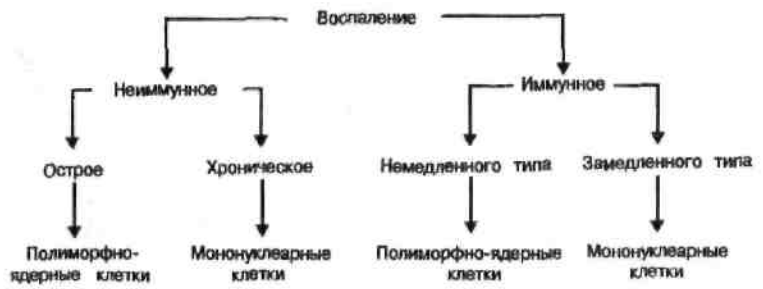


Рис. 96. Классификация воспалительного процесса.

Модели неиммунного острого воспаления таких как кротонное масло, или (при использовании морских свинок) ультрафиолетовым облучением. Хотя эти модели используются достаточно широко, они имеют определенные

Кожное тестирование недостатки. Во-первых, кожу необходимо Разработано несколько моделей острой вое- брить или депилировать перед аппликацией паления кожи. Воспалительная реакция вызы- раздражителя, что само по себе может вызвать вается местной аппликацией раздражителей, некоторое раздражение. Во-вторых, кожные

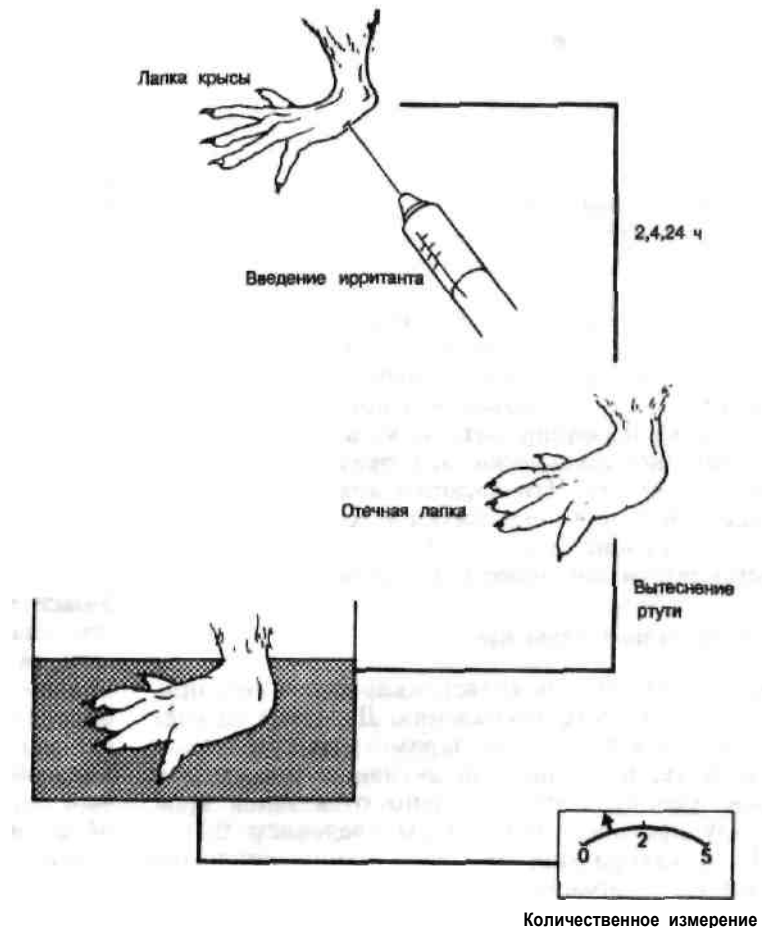


Рис. 97. Индукция экспериментального отека лапы у крыс.

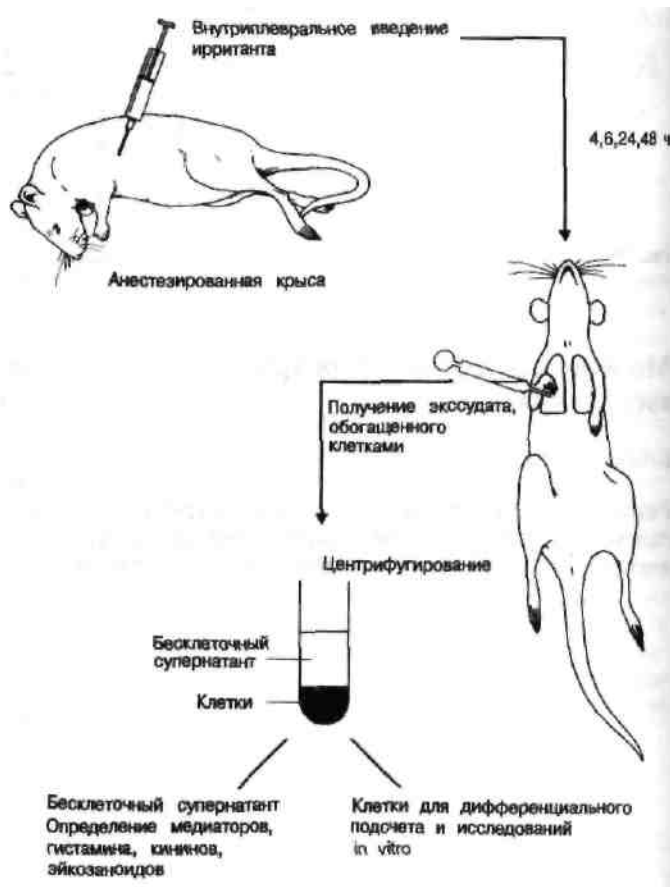


Рис. 98. Индукция экспериментального плеврита у крыс.

тесты зависят от измерения толщины кожи (индурация) и эритемы (субъективно, но количественно определяют измерением диаметра), которое трудно объективизировать. Сделаны попытки перфузировать кожу в подобных моделях, но технически это оказалось трудно-выполнимым. Что касается кожного тестирования в целом, недостатки здесь преобладают над достоинствами, поэтому данные модели становятся все менее популярными.

Отек задней лапы крыс

Отек или опухоль является кардинальным признаком острого воспаления. Действие на отек относится к важным параметрам при оценке веществ, потенциально активных при остром воспалении. Первоначально отек лапы крыс индуцировался подкожным введением 0,1 мл 1% раствора каррагенана в подошвенную поверхность правой задней лапы. Отек, который достигал максимума примерно через 6 ч, ко-

личественно оценивался объемом вытесненной ртути, что определялось потенциометром (рис. 97).

В ряде исследований при анализе отека задней лапы отмечено, что реакция зависит от активации системы комплемента (см. главу 12). Так, истощение комплемента вызывает сильное подавление реакции. Отек развивается в результате последовательного выделения фармакологических медиаторов- гистамина, 5-окситриптамина, кинина и простагландинов (см. главы 9, 10, 13). При использовании этой модели важно регистрировать действие потенциальных противовоспалительных веществ в определенные периоды развития отека. При раннем введении можно выявить антигистаминный препарат, несколько позднее-кининовый антагонист. Идеально лапу следует измерять в нескольких временных точках, но обязательно на 3-4-й час, поскольку при этом учитывается участие всех химических медиаторов. Данный тест имеет исключительно важное зна-

чение для определения ингибиторов циклооксигеназы (см. главу 25). Интересно отметить, что в практику он был введен при разработке индометацина.

Модель отека задней лапы крыс остается наиболее признанным тестом при определении противовоспалительной активности. У данной системы имеется ряд преимуществ перед другими моделями. Главные ее достоинства — удобство и воспроизводимость.

Используя одну группу крыс, можно определить развитие отека во времени, что снижает стоимость исследования. Наибольшим неудобством модели является сложность количественного определения. Лапа отекает вследствие введения раздражителя, поэтому при завершении измерений невозможно исследовать клетки и их изменения под действием лекарственных препаратов. Клеточный компонент может быть определен на гистологических срезах, что требует значительных затрат времени.

Экспериментальный плеврит

Введение раздражающих веществ в закрытые полости тела приводит к образованию жидкого экссудата с большим содержанием клеток. Первоначально использовалась брюшная полость, однако ее обширные размеры и присутствие желудочно-кишечного тракта затрудняют количественное определение объема жидкости и ее состава. Наиболее подходящей полостью для изучения воспалительной реакции оказалась плевральная полость.

Экспериментальный плеврит в течение многих лет использовался для изучения воспалительных реакций, а не для поиска противовоспалительных веществ. В последние 15 лет модель стали широко использовать фармакологи. В данной системе ирритант вводят в плевральную полость крыс. Обычно кожу на одной стороне грудной клетки оттягивают и лезвием скальпеля делают разрез над III и IV ребрами. С помощью толстой иглы 0,1 мл раздражающего вещества (обычно каррагенана) вводят в плевральную полость (рис. 98). Для получения экссудата без примеси крови вновь используется толстая игла. При загрязнении экссудата кровью его следует отбросить. Исследуемое соединение вводят перед внутривидеальной инъекцией ирританта. Животных забивают через 4 или 24 ч, удаляют экссудат, измеряют его объем, а также проводят общий и дифференцированный подсчет клеток. В опытных руках система дает исключительно воспроизводимые

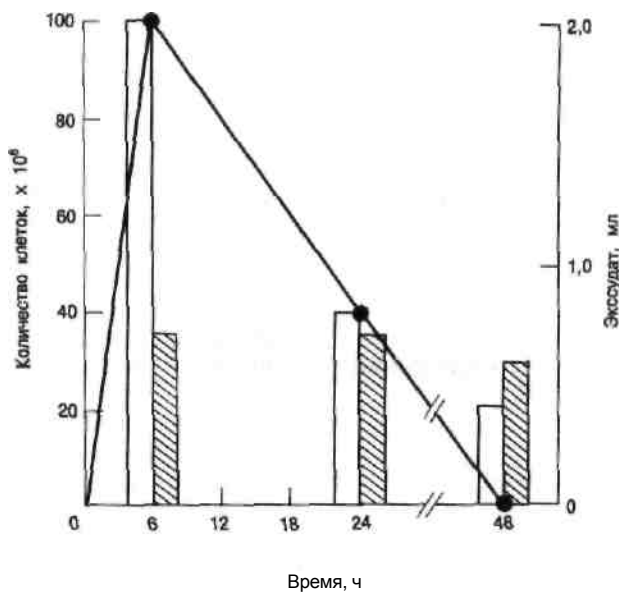


Рис. 99. Накопление клеток и образование экссудата в плевральной полости после введения каррагенана.

результаты как в отношении объема экссудата, так и при подсчете клеток (рис. 99). В течение ряда лет использовались различные ирританты, включая терпентин (к его недостаткам относится разрушение мигрирующих лейкоцитов) и каррагенан. Каррагенановый плеврит обеспечивает выделение гистамина, 5-окситриптамина, кининов и простагландинов.

Экспериментальные модели плеврита позволяют выявить ингибиторы циклооксигеназы, такие как классические нестероидные противовоспалительные препараты и новые двойные блокаторы, подавляющие циклооксигеназные и липоксигеназные ферменты, например BW755C. Однако эту систему нельзя использовать для определения медленно действующих препаратов или препаратов, модифицирующих заболевание, таких как D-пеницилламин (см. главу 31), левамизол или золото (см. главу 32), которые обладают терапевтической активностью при лечении хронических воспалений суставов. Напротив, эти вещества потенцируют воспалительную реакцию в данной системе.

Возможным ирритантом, вызывающим воспаление, наиболее близкое к клиническому, является кальций-пирофосфатдигидрат (КПФДГ). Его кристаллы вызывают неиммунную реакцию. Причиной их выбора в качестве ирританта является их обнаружение в суставах больных хондрокальцинозом или псевдо-

подагрой. В отличие от каррагенана действие КПФДГ не зависит от системы комплемента, однако медиаторы выделяются в той же последовательности. Ответ на стероидные и нестероидные препараты сравним с ответом на модели каррагенанового плеврита. К достоинствам данной системы следует отнести тот факт, что сравнение полученных данных с результатами каррагенанового теста позволяет дать заключение о действии препаратов на систему комплемента. Препараты, подавляющие воспаление, зависимое от комплемента, неактивны в отношении плеврита, вызванного КПФДГ.

Предполагается, что в моделях плеврита можно определять стероидные и нестероидные препараты по их действию на 24-часовое повреждение. Однако это предположение следует подтвердить.

К достоинствам модели плеврита относятся ее легкая объективизация и доступность как экссудата для биохимического анализа, так и клеток для морфологического исследования. Недостатком модели является необходимость подготовки группы животных для каждого временного интервала, что представляет сложность для оператора и повышает стоимость эксперимента.

Шестидневный воздушный пузырь

Первоначально Ганс Селье показал, что введение воздуха в дорсальную поверхность крыс приводит к образованию полости, в которой можно изучать воспаление. С тех пор обнаружено, что воздушный пузырь можно использовать в качестве модели острого воспаления через 6 дней после его образования. При этом методе анестезированной крысе вводят 20 мл воздуха в дорсальную поверхность. Через 3 дня для поддержания полости в неспаавшемся состоянии вводят дополнительно 10 мл воздуха, а через 6 дней после первого введения воздуха в полость вводят раздражающее вещество. Необходимо именно 6 дней для развития структур, выстилающих полость. Выстилающая структура, состоящая из макрофагов и фибробластов, обладает некоторым сходством с синовиальной тканью, выстилающей полость сустава. Развитие этой выстилающей структуры позволяет определить реакцию на ирританты в течение 24 ч. Как и в плевральной полости, в воздушном пузыре образуется бесклеточный экссудат, который можно оценить количественно и качественно (рис. 100). Одно-

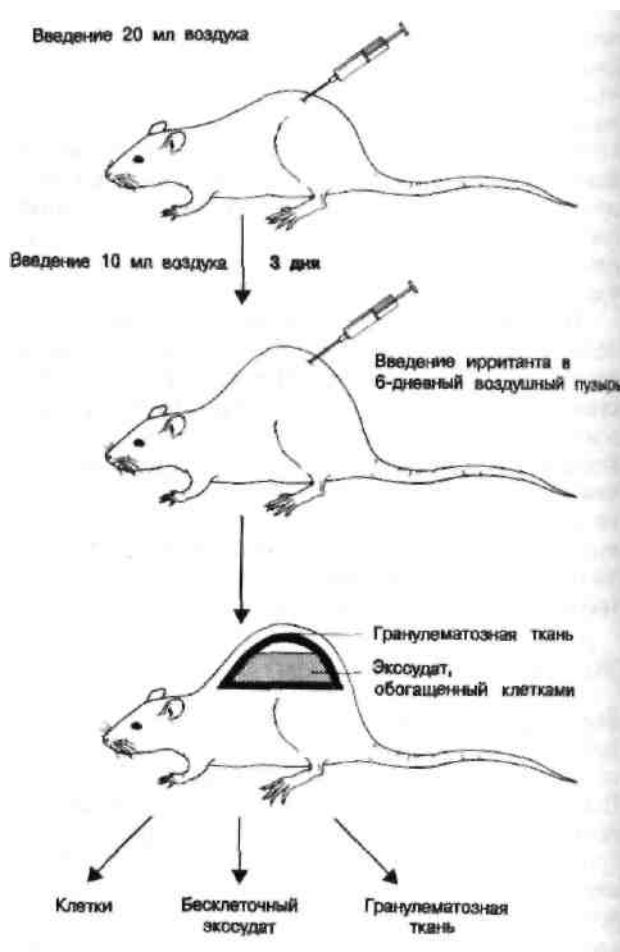


Рис. 100. Индукция воспаления в 6-дневном воздушном пузыре.

дневный воздушный пузырь непригоден для изучения острого воспаления.

К достоинствам данной системы относится возможность прямого определения соединений для лечения синовитов, а недостатками являются большая затрата времени для получения самого воздушного пузыря и необходимость адаптации животных.

Имплантация полиэфирной губки

В ряде исследований для моделирования острого воспаления используются кусочки полиэфирной губки, которые имплантируются крысам подкожно. У анестезированных животных делают разрез на вентральной или дорсальной поверхности. Губку грубо рассекают, смачивают ирритантом (каррагенаном) и помещают

в разрез, который закрывают зажимом Michel. Через разные интервалы времени губку удаляют, а клетки и экссудат получают простым выжиманием или обработкой раствором трипсины.

Данная модель успешно использовалась для изучения изменений концентрации эйкозаноидов при остром воспалении. В то же время у нее есть ряд недостатков по сравнению с экспериментальным плевритом. Во-первых, губка вызывает реакцию чужеродного тела совместно с эффектом ирритантного соединения, поэтому триггерный механизм воспаления представляется слишком сложным. Более того, выжимание губки может привести к искусственному образованию медиаторов. Кроме того, данная модель не позволяет определять объем экссудата.

Разные группы исследователей используют губки разных размеров, что затрудняет сравнение полученных результатов. Кроме того, в некоторых лабораториях имплантируют несколько губок одному животному, чтобы увеличить размер образца. В этом случае остается открытым вопрос об определении размера раздражения, поскольку воспаление одной области влияет на воспаление в другой.

Несмотря на все эти недостатки, губка очень эффективна для определения блокаторов циклооксигеназы, а также двойных блокаторов. Как и в модели плеврита, в данной системе не определяются вещества, модифицирующие заболевание.

Модели иммунного острого воспаления

Локальная реакция Шварцмана - местное воспаление кожи

Иммунная кожная реакция индуцируется у кроликов или у морских свинок внутрикожной инъекцией эндотоксина (см. главу 19) после внутривенного введения эквивалентной дозы препарата. Максимальная интенсивность реакции наблюдается между 4-м и 24-м часом после инъекции. В исследованиях показано участие в реакции альтернативного пути активации комплемента (см. главу 12). В результате реакции появляется эритематозная индурация, которую (как и все кожные реакции) трудно измерить количественно. В связи с этим лишь немногие работы выполнены на фармакологической модификации этой модели.

Реакция Артюса

Реакция Артюса, которая является реакцией иммунных комплексов, оригинально описана в коже; однако наиболее эффективно она проявляется в плевральной полости. На крысах используется обратная пассивная реакция Артюса. Кроликов иммунизируют бычьим сывороточным альбумином и полученные антитела тщательно очищают. Наиболее важно очистить гамма-глобулиновую фракцию анти-БСА. Внутривенное введение крысам цельной кроличьей сыворотки вызывает образование экссудата, обогащенного полиморфно-ядерными клетками. Для индукции обратной пассивной реакции Артюса крысам внутривенно вводят БСА, а спустя 20 мин внутривенно вводят 0,2 мл БСА. Через 6 ч наблюдается максимальное образование экссудата, который достигает объема 2 мл и представляет собой жидкость, обогащенную белком, с большим количеством полиморфно-ядерных лейкоцитов. Затем реакция быстро затухает. Данный метод хорошо воспроизводим; могут быть определены внеклеточные и внутриклеточные медиаторы. Реакция почти полностью подавляется при истощении периферического гемолитического комплемента фактором яда кобры. Интересно, что в данной модели только стероиды могут значительно уменьшать воспаление; нестероидные противовоспалительные препараты активностью не обладают.

Неиммунное хроническое воспаление

Хлопковая гранулема

Кусочки хлопка одинакового веса, свернутые в форме зуба, подкожно имплантируют крысам на вентральную или дорсальную поверхность. Хлопок вместе со сформировавшейся гранулемой удаляют через 7 дней и определяют влажный и сухой вес. В этой модели учитывается ряд аспектов хронического воспаления, так как она представлена фибробластами, макрофагами и вновь образованными кровеносными сосудами. Хотя модель определяется как «неиммунный» неспецифический тип воспаления, в ней, очевидно, присутствует иммунный компонент. Если экстрактом гранулематозной ткани в адьюванте Фрейнда проиммунизировать крыс, то имплантация сенсibilизированным животным кусочков хлопка приводит к значительному увеличению объема образуе-

мой гранулематозной ткани. Показано, что продукты гранулематозной ткани потенциально антигенны и, возможно, действуют, как эндогенный антиген. Выявлено значительное уменьшение реакции на кусочки хлопка при неонатальной тимэктомии, что свидетельствует о представлении в ней иммунного компонента Т-клетками. В данной системе определяются нестероидные противовоспалительные препараты и стероиды, причем последние активны в очень низких дозах. Метод прост в выполнении, но требует введения исследуемых веществ в течение 7 дней, что не всегда желательно при поиске новых соединений, доступных только в малых количествах. В этом тесте выявляется влияние веществ на миграцию и пролиферацию клеток; к его недостаткам следует отнести необходимость детального гистологического исследования.

Шестидневный воздушный пузырь

Выше уже был описан 6-дневный воздушный пузырь, используемый для изучения острого воспаления. Эта модель наиболее пригодна и для исследования хронического воспаления, а именно-синовита. Ввиду его размеров большое количество каррагенана или другого ирриганта вводят в полость и измеряют развивающееся воспаление. Первоначально доминируют полиморфно-ядерные клетки, которые сменяются преимущественно мононуклеарными популяциями. Применяя в качестве ирриганта каррагенан, с помощью нестероидных противовоспалительных препаратов можно подавить клеточную и экссудативную реакцию. В последнее время распространение получила модификация, при которой в 6-дневный пузырь вносится хрящ. Есть надежда, что подобная модификация поможет фармакологам в поиске веществ, предупреждающих эрозию твердых тканей при артритах.

Иммунное хроническое воспаление

Клеточно-опосредованный экспериментальный плеврит

У крыс и морских свинок могут быть индуцированы клеточно-опосредованные воспалительные реакции. Морских свинок сенсibilизируют полным адьювантом Фрейнда. Спустя 2,5-4 нед сенсibilизированным животным внутривнеплеврально вводят разрешающую дозу

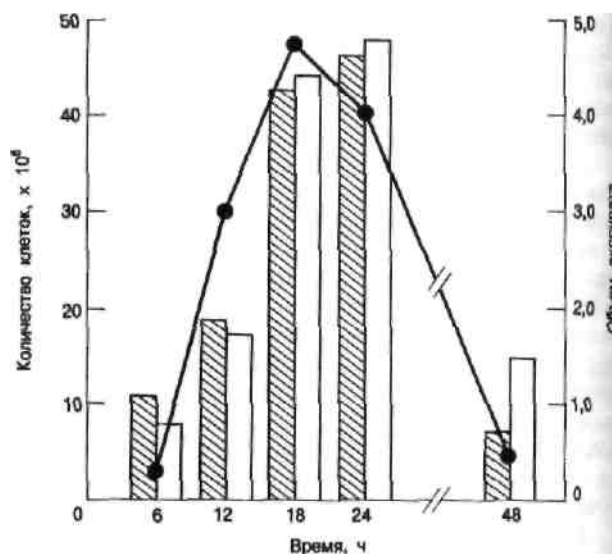


Рис. 101. Клеточное накопление и образование экссудата в плевральной полости у морской свинки после введения туберкулина.

очищенного белка туберкулезных бацилл. В плевральной полости реакция развивается медленно, достигая максимума через 18-24 ч после инъекции. При типичной реакции через 6 ч после введения очищенного белка образуется 0,5 мл экссудата, а к 18-му часу-5 мл; затем реакция медленно затухает, и к 48-72-му часу плевральная полость возвращается к исходному состоянию. Экссудат содержит много клеток, в основном мононуклеарного типа (рис. 101).

В отличие от реакции Артюса туберкулиновая реакция почти не вызывает выделения гистамина в плевральную полость, зато в умеренном количестве выделяется 5-окситриптамиин. Содержание простагландинов достигает максимума примерно к 12-му часу, что по времени близко к пику воспалительной реакции.

Почти тотальное удаление периферического компонента не влияет на развитие клеточных и сосудистых реакций.

Клеточно-опосредованные иммунные реакции могут также индуцироваться в плевральной полости крыс при введении вакцины *Wogdetella pertussis*. Крысам, сенсibilизированным коклюшной вакциной в неполном адьюванте Фрейнда, внутривнеплеврально вводят разрешающую дозу той же вакцины. Это приводит к образованию экссудата (максимум при-

ходится на 48-й час), причем в нем доминируют мононуклеарные клетки.

Интересно, что данная модель является одной из тех немногих, где показано подавление воспаления D-пеницилламином, индометацином и левамизолом. Введение до сенсибилизации и продолжение терапии этими тремя препаратами во время развития воспаления вызывает подавление реакции. С другой стороны, введение D-пеницилламина и левамизола одновременно с разрешающей дозой антигена усиливает реакцию, а введение индометацина ее подавляет. Таким образом, остается нерешенной проблема выбора модели, способной давать позитивные результаты с разными группами клинически используемых препаратов для лечения артрита.

Реакция смешанной гиперсенситивности в шестидневном воздушном пузыре

Смешанные реакции гиперсенситивности могут быть индуцированы в 6-дневном воздушном пузыре с помощью вакцины Bordetella pertussis. Крысы сенсибилизируют коклюшной вакциной в неполном адьюванте Фрейнда, а спустя 6 дней на дорсальной поверхности животных формируют воздушный пузырь. На 6-й день развития воздушного пузыря или на 12-й день сенсибилизации в его полость вводят коклюшную вакцину. Реакция начинается с проникновения полиморфно-ядерных клеток, а затем мононуклеарных клеток. Эйкозаноиды, простагландин E₂ и лейкотриен В₄ определяются в экссудате вплоть до 13-го дня после введения раздражителя. Блокаторы циклооксигеназы способны подавлять эту реакцию, а D-пеницилламин обладает потенцирующим действием. Дексаметазон полностью подавляет реакцию.

Адьювантный артрит

Основной моделью адьювантного артрита является введение убитых прогреванием *Mycobacterium tuberculosis*, суспендированных в жидком парафиновом или минеральном масле, в заднюю лапу или в хвостовую кость. После инъекции указанного материала в лапу в течение 3 дней развивается неспецифический воспалительный отек, который сменяется иммунологически индуцированным отеком другой лапы, в которую ничего не вводили. Между 16-м и 30-м днем наблюдается максимальный отек, приводящий к срастанию поверхностей

суставов. Затухание сильного воспаления происходит через 30-40 дней.

Другие вещества, такие как небольшие фрагменты стенки клеток микобактерий и мурамилдипептид, могут индуцировать заболевание при введении эмульсии, приготовленной на неполном адьюванте Фрейнда, под кожу стопы. CP-20961 [N,N-диоктадецил-N',N'-бис(2-оксиэтил)-пропаредиамин] - неиммунный синтетический адьювант, суспендированный в парафиновом масле, может индуцировать хронический артрит, аналогичный наблюдаемому при введении других адьювантов.

Животными выбора являются 13-30-дневные крысы. Адьювантные артриты различаются у разных линий, и наиболее удобными являются инбредные крысы Льюис.

Этиология адьювантного артрита неизвестна, но косвенные данные свидетельствуют о наличии неидентифицированных антигенов, которые, активируясь, усиливают T-клеточный иммунитет и вызывают воспаление в тканях сустава. Это также подтверждается фактом переноса заболевания сенсибилизированными лимфоцитами.

Роль простагландинов установлена при выявлении чувствительности модели к ингибиторам циклооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты. Воспаление, индуцированное адьювантами, также эффективно подавляется стероидами. Действие других препаратов в значительной степени зависит от дозового режима. Белки острой фазы, например α-гликопротеин, используются в качестве биологического маркера воспаления, индуцированного адьювантами. Данный показатель снижается при применении нестероидных противовоспалительных препаратов и стероидов.

Артриты крыс, вызванные коллагеном II типа

Данная модель основана на использовании нативного коллагена II типа, полученного из эмбрионов цыплят или человека и тщательно эмульгированного в неполном адьюванте Фрейнда. Эмульсию вводят внутрикожно в несколько мест или подкожно в заднюю лапу или хвост. Коллагениндуцированные артриты также зависят от линии используемых животных. Появление артритов наблюдается через 12-13 дней после разрешающей инъекции, а пик развития воспаления приходится на 21-28-й день после сенсибилизации коллагеном. Воспаление

остаётся на одном уровне или постепенно уменьшается с 28-го по 50-й день.

Точный механизм развития коллагенового артрита неясен, но поскольку в нём участвует процесс иммунизации потенциальными аутоантигенами (коллаген II типа), то представляется вероятным, что в заболевании важную роль играет иммунитет к нативным коллагеновым молекулам. Артриты, вызванные коллагеном II типа, успешно подавляются нестероидными противовоспалительными препаратами и стероидами.

Моноуставные артриты

Каррагенан, зимозан и многие другие раздражающие вещества при введении в полость

сустава вызывают моноартрит. Хронические воспалительные реакции индуцируются лишь многократными инъекциями.

Дж. К. Формен, Ф. Л. Пирс (J. C. Foreman, F. L. Pearce)

Разработка и клинические эффекты хромогликата

Использование хромогликата как антиаллергического препарата было начато в Великобритании в 1967 г. Препарат (рис. 102) разработан на основе хромона (келлина), выделенного из семян восточно-средиземноморского растения *Amni visnaga*. Келлин обладает сосудорасширяющим действием и расслабляет гладкие мышцы, но его применение ограничено ввиду побочных токсических эффектов. Хромогликат служит примером препарата, действие которого было открыто при использовании у людей, а не в результате рациональной экспериментальной работы на животных моделях. Антиастматический эффект хромогликата был обнаружен Altounyan, который ввел себе препарат во время астматического приступа, вызванного ингаляцией пылевых антигенов, к которым он был сенсибилизирован. Ингаляция 20 мг хромогликата обеспечивает 90% защиты от вызываемой антигеном обструкции дыхательных путей, если препарат принимается за 2 ч до антигена. Эффективность препарата уменьшается по мере увеличения промежутка времени между его приемом и введением антигена, но даже при увеличении этого промежутка до 18 ч некоторая активность лекарства сохраняется.

Хромогликат не всасывается после приема внутрь и эффективен только при попадании на слизистую оболочку бронхов при ингаляции. Хромогликат отличается от других препара-

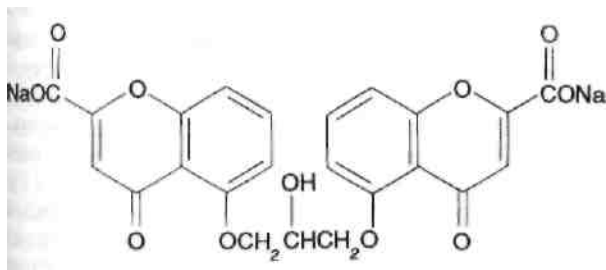


Рис. 102. Структура хромогликата.

тов, эффективно применяемых при астме (например, от B_2 -адреномиметиков и кортикостероидов), отсутствием действия при использовании после введения антигена, тогда как последние эффективны после антигена.

Хромогликат эффективен при некоторых аллергических заболеваниях, отличных от астмы, например при аллергическом рините, атопических заболеваниях глаз. Он также эффективен при формах астмы, не имеющих аллергической основы, включая астму, индуцированную физической нагрузкой, и неатопическую или криптогенную астму. Активность хромогликата не зависит от аллергии к какому-либо особому антигену. Показано, что хромогликат предупреждает как аллергическую астму, опосредованную классическим взаимодействием IgE-антиген (см. главу 2), так и астму, опосредованную взаимодействием IgG-антиген.

Астма и клиническая фармакология хромогликата

Неотъемлемой характеристикой всех больных астмой является гиперреактивность дыхательных путей как к специфической стимуляции антиген/антитело, так и к неспецифическим стимулам, включая химические соединения (например, гистамин, метахолин и двуокись серы), а также к охлаждению.

Бронхиальная провокация аллергеном у больных аллергической астмой вызывает бронхоконстрикцию, обычно определяемую как снижение объема форсированного выдоха за 1 с (ОФВ1); причем эта реакция может быть двухфазной (рис. 103). Реакция на аллерген с немедленным началом и разрешением через 1-2 ч сменяется в некоторых случаях поздней реакцией, начинающейся через 4-6 ч после провокации аллергеном и длящейся несколько часов. Хромогликат предупреждает как немедленную, так и позднюю реакции (см. рис. 103).

Общепринято, что немедленная реакция вызывается медиаторами, выделяемыми туч-

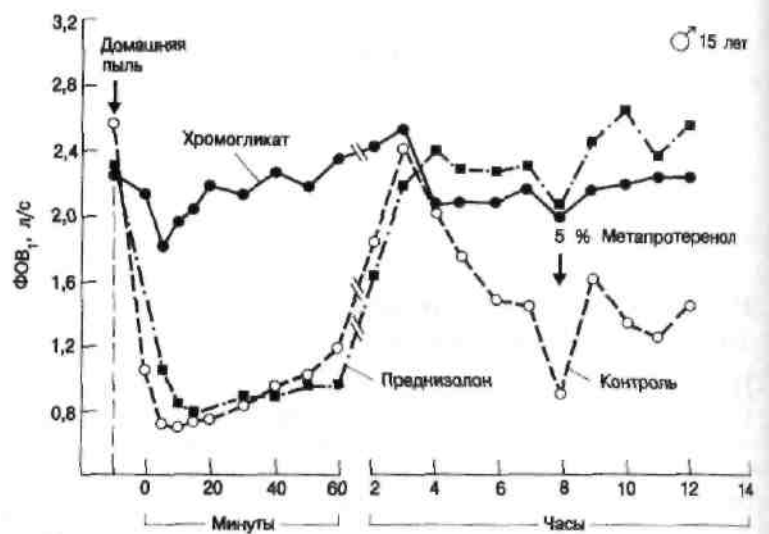


Рис. 103. Влияние хромогликата на раннюю и позднюю фазы бронхиальной реакции у больного с аллергией к домашним полевым клещам.

ными и другими клетками. Механизм поздней реакции и ее взаимоотношения с ранней реакцией пока непонятны. У некоторых больных выявляется только поздняя или только ранняя реакция, поэтому невозможно утверждать, что события немедленной реакции необходимы для формирования поздней. Возможно, что медиаторы обеих реакций образуются во время поступления аллергена. Одни медиаторы, например гистамин (см. главу 9) и метаболиты арахидоната (см. главу 10), вызывают немедленные эффекты, а другие, такие как ФАТ, обладают отсроченным действием. Проявления немедленной или поздней реакции определяются количествами каждого типа медиатора, образованным любым данным стимулом. Как будет сказано ниже, получены доказательства того, что хромогликат предупреждает выделение медиаторов, вызывающих немедленную реакцию (гистамин), но это не означает, что он предупреждает выделение медиаторов поздней реакции. Есть данные, что хромогликат отменяет некоторые эффекты ФАТ (см. главу 16). Таким образом, противовоспалительное действие хромогликата может складываться из нескольких механизмов.

Ингаляция хромогликата в настоящее время принята в качестве надежного метода лечения астмы, индуцированной физической нагрузкой. Одним из важных начальных событий при данном виде астмы является сужение бронхов вследствие охлаждения дыхательных путей. Оно возникает в результате увеличенной потери тепла и латентного тепла испарения

при гипервентиляции, сопровождающей нагрузку. Величина этого эффекта зависит от природы, интенсивности и длительности нагрузки, т. е., в конце концов, от частоты и глубины вентиляции, а также от температуры и влажности вдыхаемого воздуха. Механизм, посредством которого охлаждение дыхательных путей вызывает бронхоспазм, неизвестен. Возможно, что охлаждение гиперреактивных дыхательных путей само по себе вызывает сокращение гладких мышц за счет прямой или непрямого стимуляции сенсорных рецепторов и последующей активации суживающих рефлексов блуждающего нерва. Альтернативно охлаждение может приводить к выделению из тучных клеток таких медиаторов, как гистамин, что наблюдается при холодовой крапивнице. Дополнительно к охлаждению при испарении потеря воды со слизистой оболочки бронхов может привести к образованию гиперосмолярной среды в тканях, что либо прямо вызовет выделение медиаторов, либо усилит реакцию дыхательных путей на иммунную стимуляцию тучных клеток легких.

При астме, индуцированной физической нагрузкой, как у больных с аллергической формой заболевания, так и у астматиков-неаллергиков отмечается выделение в плазму медиаторов тучных клеток-гистамина и хемотаксического фактора нейтрофилов (см. главу 11). Выявлена корреляция между временем появления этих медиаторов и развитием бронхоспазма, а также между их концентрацией и силой бронхоспазма. Лечение таких больных хромо-

гликатом перед нагрузкой предупреждает как развитие бронхоконстрикции, так и выделение указанных медиаторов. Отсюда сделано заключение, что действие хромогликата связано с предупреждением выделения медиаторов тучными клетками; однако имеются сообщения об индуцированной физической нагрузкой астме, приступы которой не сопровождаются увеличением в плазме гистамина; но и в этом случае заболевание можно было предупредить хромогликатом.

Выше отмечалось, что хромогликат обладает разными механизмами действия на немедленную и позднюю фазы астматической бронхоконстрикции. Более того, выявлена дивергентность кривых доза-эффект для хромогликата как профилактического средства при бронхоконстрикции, вызванной антигеном, и при астме, индуцированной двуокисью серы. Это также свидетельствует в пользу того, что хромогликат действует посредством разных механизмов в зависимости от природы стимула (специфический, аллергический или неспецифический).

Важно отметить, что хромогликат не обладает бронхорасширяющей, противовоспалительной или антихолинергической активностью. Он также не является антагонистом гистамина или других медиаторов острых аллергических реакций. Помимо возможного влияния хромогликата на выделение медиаторов предполагается (по данным последних исследований) его действие на нервные механизмы, принимающие участие в астме.

Действие основного констрикторного механизма в дыхательных путях обеспечивается холинергической парасимпатической нервной системой. Дыхательные пути человека получают обильную холинергическую иннервацию через блуждающий нерв, синапсы эфферентных волокон которого находятся в ганглиях, локализованных в стенках дыхательных путей. Электрическая стимуляция блуждающего нерва у животных вызывает сужение просвета бронхов, которое частично блокируется мускариновым антагонистом атропином или ганглиоблокатором гексаметонием. Среди бронхолегочных афферентных волокон, проходящих в блуждающем нерве, находятся волокна, идущие от ирритантных рецепторов эпителия трахеи и бронхов. Эти рецепторы стимулируются гистамином и, возможно, другими медиаторами анафилаксии и вызывают рефлекторную бронхоконстрикцию, которая блокируется пересечением блуждающего нерва или атропи-

ном. Этот эффект был детально изучен на собаках, у которых при анестезии хлоралозой ингаляция гистамина приводила к выраженному повышению сопротивления дыхательных путей. Данный эффект индуцируется также прямой электрической стимуляцией эфферентных вагусных нервов и подавляется охлаждением блуждающего нерва до возникновения блока проводимости. Более того, хромогликат ослабляет бронхоконстрикцию, вызванную гистамином, но не действует на бронхоспазм, обусловленный прямой электрической стимуляцией вагуса. Сначала это действие препарата связывали с десенситизацией ирритантных рецепторов легких. Аналогичный механизм предлагается для объяснения защитного действия хромогликата при бронхоспазме, вызванном двуокисью серы у людей. Однако электрофизиологическая регистрация с одиночных волокон, идущих от ирритантных рецепторов легких у собак, не выявила какого-либо влияния хромогликата ни на фоновые разряды, ни на разряды, индуцированные гистамином. Напротив, препарат повышает скорость разрядов рецепторов, расположенных в эндокарде левого желудочка сердца собак. На этом основании утверждается, что ирритантные легочные рецепторы у собак, которые стимулируются гистамином (а возможно, и другими стимулами), вызывают бронхоспазм, а рецепторы левого желудочка, чувствительные к хромоглилату, подавляют их рефлекторное действие. Пока неясен механизм, посредством которого активация последних рецепторов предупреждает или отменяет бронхоконстрикцию. Вероятно, повышенная активность рецепторов левого желудочка подавляет активность центральной нервной системы, которая связана с рефлекторными бронхоконстрикторными механизмами в стволе мозга.

В более поздних исследованиях определялось действие хромогликата на волокна миелинизированных афферентных нервов (С-волокна), связанных с чувствительными нервными окончаниями в легких собак. Стимуляция этих окончаний капсаицином вызывает рефлекторную бронхоконстрикцию, а хромогликат подавляет возбуждение. Возможно, что хромогликат подавляет рефлекторные бронхоконстрикторные реакции, возникающие при стимуляции С-волокон или соответствующих чувствительных рецепторов в легких человека. Независимо от точных механизмов данного процесса, кажется вполне вероятным, что превентивное действие хромогликата при астмати-

ческих реакциях на неспецифические стимулы опосредуется нейрофизиологическими механизмами.

Таким образом, обсуждается в основном профилактика хромогликатом бронхоспазма, вызванного специфическими или неспецифическими стимулами. Как уже отмечалось, ведущей патологией при астме является гиперреактивность дыхательных путей к различным агентам. В связи с этим возникает вопрос, каким образом хромогликат изменяет реактивность дыхательных путей. Здесь могут рассматриваться как влияние хромогликата на выделение медиаторов, так и его действие на нервные пути. Существуют сведения о том, что хромогликат снижает чувствительность дыхательных путей к гистамину, но, поскольку он не обладает активностью антагониста гистаминовых рецепторов, предполагается, что его действие связано с уменьшением реактивности дыхательных путей. Эта идея должна быть рассмотрена критически, так как **не** во всех исследованиях получены результаты, подтверждающие ее правильность.

Исследование механизма действия хромогликата на экспериментальных моделях *in vivo*

Уникальная превентивная активность хромогликата в отношении аллергической астмы первоначально была выявлена у человека. Подобный подход не может быть использован для поиска новых препаратов, поэтому для таких целей разработан ряд животных моделей.

Респираторная анафилаксия

Респираторная анафилаксия у человекообразных приматов служит моделью бронхиальной астмы человека. Обезьяны, sensibilizированные к антигену *Ascaris*, реагируют на последующую ингаляцию аэрозольного антигена выраженным ухудшением некоторых функций легких - скорости потока воздуха, объема дыхания, транслегочного давления, общего легочного сопротивления и динамической податливости легких.

Вызванные антигеном нарушения легочных функций у sensibilizированных обезьян в том же исследовании ослаблялись хромогликатом. Однако эти результаты не были подтверждены всеми последующими исследованиями, хотя

в данной системе отмечена активность других, более сильных хромогликатоподобных препаратов. Причина такого несоответствия непонятна и, возможно, связана с условиями иммунизации экспериментальных животных. Несмотря на эти различия, совершенно очевидно, что изучение дыхательных функций на экспериментальной модели приматов - наиболее доступное и адекватное исследование для определения потенциальной антиастматической активности соединений. Ввиду технических трудностей и высокой стоимости эксперимента с использованием приматов вряд ли можно считать данную систему пригодной для начального скрининга новых антиастматических препаратов.

Для изучения дыхательной анафилаксии широко используются морские свинки и крысы. У крыс после активной или пассивной sensibilizации определяется бронхоконстрикция. В последней системе хромогликат, как правило, более эффективен в предупреждении повышения резистентности дыхательных путей и оказывает довольно слабое действие у активно sensibilizированных животных. Причины этого не вполне понятны, но они могут отражать различия механизмов, участвующих в развитии бронхоконстрикции в обоих случаях. В отличие от крыс влияние хромогликата на анафилактическую бронхоконстрикцию у морских свинок менее выражено. В первых исследованиях было обнаружено, что хромон в подобной системе неэффективен. В более поздних работах препарат в определенных условиях частично ослаблял реакции, опосредованные IgE-антителами, но не влиял на реакции, опосредованные IgG. Сниженная активность хромогликата в данной системе почти наверняка отражает видовую и тканевую специфичность хромона. Тучные клетки морских свинок оказались достаточно рефрактерными к данному соединению. Аналогично этому, препарат не предупреждает острой системой анафилаксии у телят, sensibilizированных сывороткой лошади, причем легкие у телят являются главным шоковым органом. Препарат обладает слабым и непостоянным действием на респираторные реакции у собак.

Пассивная перитонеальная анафилаксия у крыс

Для создания данной модели сначала производят пассивную sensibilizацию тучных клеток перитонеальной полости крыс внутрибрюшин-

ной инъекцией IgE-антител. Последующее введение соответствующего антигена приводит к высвобождению медиаторов тучных клеток, таких как гистамин и лейкотриены. После обнаружения этих веществ в перитонеальной жидкости их стали использовать как показатель активации тучных клеток. Затем метод модифицировали, вводя внутривенно животным маркер (краситель) перед внутрибрюшинным введением антигена. Последующее попадание красителя в перитонеальную полость может использоваться как показатель воспаления в брюшной полости. Инъекция хромогликата непосредственно перед нагрузкой антигеном почти полностью подавляет выделение гистамина и несколько уменьшает проникновение красителя, а также выделение лейкотриенов. Основной трудностью в интерпретации результатов является изменение концентрации выделившихся медиаторов, которое определяется не только скоростью их выделения, но и скоростью их удаления из брюшной полости вследствие абсорбции и метаболизма. Тем не менее данный метод дополнительно позволяет оценить действие препаратов на воспаление в брюшной полости в результате активации тучных клеток. Экстравазация серозной жидкости в просвет бронхов больных астмой вносит определенный вклад в патогенез заболевания, поэтому препараты, влияющие на данный процесс, могут иметь клиническую ценность. Однако степень достоверности, с которой активность препаратов, подавляющих перитонеальную анафилаксию у крыс, прогнозирует подобную активность у человека, достаточно ограничена.

Пассивная кожная анафилаксия

Опосредованные IgE реакции пассивной кожной анафилаксии (ПКА), особенно у крыс, очень широко используются для первичного скрининга антиаллергических соединений. В этой модели воспалительные медиаторы, высвобождаемые в результате реакции гиперсенситивности немедленного типа в коже, вызывают локальное повышение проницаемости капилляров. Ее измерение позволяет установить интенсивность кожной анафилактической реакции. В модели обязательно используются внутрикожное введение соответствующего количества IgE-антител. После латентного периода (24-72 ч), в течение которого наблюдается сенсибилизация тучных клеток кожи, животному внутривенно вводят смесь антигена и маркера.

Затем животное забивают и удаляют кожу спины для исследования подкожного слоя. Экстравазация маркера устанавливается путем определения диаметра отечных поражений или при экстракции с последующим спектрофотометрическим определением красителя. Альтернативно экстравазацию можно определить с помощью радиоактивного высокомолекулярного маркера. Исследуемые препараты обычно вводят внутривенно или (когда возможно) перорально вместе с антигеном и маркером.

Хромогликат относится к очень сильным и эффективным ингибиторам реакций ПКА (у крыс), опосредованных гомологичными IgE-антителами. Как и в других системах тестирования, активность препарата варьирует в обратной зависимости от силы анафилактической реакции, но оптимальные концентрации хромогликата могут полностью отменять реакцию. Однако кожные реакции, опосредованные IgG-антителами, труднее подавляются данными соединениями. Как и в моделях *in vitro*, активность хромогликата в модели ПКА крыс резко снижается, если антиген и препарат не вводят одновременно. Этот эффект связан с генуинной тахифилаксией, поскольку вторая доза хромона, введенная одновременно с антигеном, не подавляет реакции. Другие антиаллергические препараты могут обладать подобными тахифилактическими свойствами, а также перекрестной реактивностью с хромогликатом, т. е. первая доза одного соединения может подавлять активность последующей дозы второго соединения. Определение перекрестной тахифилаксии с хромогликатом принято в качестве критерия оценки сходства механизма действия с хромоном исследуемого соединения и может свидетельствовать о потенциальной антиастматической активности.

На первый взгляд, модель реакции ПКА крыс имеет много явных преимуществ в качестве скрининговой модели антиаллергических соединений. Она быстровыполнима, проста, и с ее помощью можно исследовать большое количество препаратов. Однако метод зависит от способности исследуемых соединений подавлять дегрануляцию тучных клеток кожи крыс. Учитывая гетерогенность реакций тучных клеток на антиаллергические соединения, трудно предопределить надежность экстраполяции результатов, полученных в данной модели, на человека. Эта точка зрения будет детально обсуждаться ниже, здесь же в подтверждение специфичности действия препарата следует отметить, что хромогликат не по-

давляет кожные анафилактические реакции *in vivo* у коров, морских свинок, людей, обезьян, мышей и кроликов. Если другие препараты обладают аналогичной специфичностью, то этот эффект может весьма серьезно ограничивать целесообразность любой экспериментальной модели при прогнозировании антиагмастической активности соединений у людей.

Исследование механизма действия хромогликата *in vitro*

Подавление выделения гистамина тучными клетками

Перитонеальные тучные клетки крыс активно используются для изучения механизма действия хромогликата по следующим причинам: во-первых, выделение гистамина тучными клетками рассматривается как основная часть патогенеза астмы; во-вторых, перитонеальные тучные клетки крыс могут служить типичным примером изолированных тучных клеток, относительно легко получаемых в очищенном виде. Однако обнаружение гетерогенности тучных клеток (см. главу 2) предполагает, что перитонеальные тучные клетки крыс не всегда являются идеальной моделью тучных клеток легких человека. Кроме того, накапливается все больше данных о том, что роль тучных клеток в патогенезе астмы не столь значительна, как это представлялось раньше. Тем не менее показано, что хромогликат подавляет выделение медиаторов из тучных клеток человека как *in vitro*, так и *in vivo*, а исследования на перитонеальных тучных клетках крыс и крысиных клетках базофильного лейкоза в настоящее время позволяют получать наиболее полную информацию о механизме действия хромогликата на клеточном уровне.

Хромогликат (1-100 мкМ) вызывает дозозависимое подавление выделения гистамина перитонеальными тучными клетками, стимулированными реакцией антиген-антитело или соединением 48/80. Степень подавления выделения гистамина под действием соединения 48/80, которая достигается при использовании хромогликата, при низком уровне стимуляции явно выше, чем при высоком. Хромогликат эффективен при его добавлении к тучным клеткам одновременно с антигеном; предварительная преинкубация клеток с препаратом снижает эффект. По данным некоторых исследований, определенные концентрации хромоглика-

та подавляют выделение гистамина тучными клетками, стимулированными антигеном, но не влияют на высвобождение медиатора под действием кальциевого ионофора A23187 (см. главу 2). Эти данные свидетельствуют о том, что хромогликат подавляет выделение гистамина, нарушая антигениндуцированный вход кальция в тучные клетки, что и было показано для хромогликата, доксантразола (родственный препарат) и дибутирила цАМФ. Активность указанных соединений как ингибиторов транспорта кальция была такой же, как и ингибиторов выделения гистамина.

Данная гипотеза представляется слишком простой: ведь если выделение гистамина тучными клетками индуцируется ионофором A23187, то EC₅₀ хромогликата для его подавления составляет 300 мкМ, а при использовании в качестве стимула антигена и соединения 48/80- 10 мкМ. Кроме того, против механизма действия хромогликата, направленного на предупреждение изменений потоков кальция, приводятся данные о блокировании хромогликатом выделения гистамина под действием стимулов, не зависящих от внеклеточного кальция. Однако это не является обязательным условием. Установлено, что выделение гистамина тучными клетками зависит от возрастания внутриклеточной концентрации ионизированного кальция (см. главу 2). Кальций имеет либо внеклеточное происхождение, либо высвобождается из внутриклеточного депо. Не исключено, что транспорт кальция через клеточную мембрану или через мембраны внутривенных депо одинаков, поэтому хромогликат может нарушать оба процесса одним и тем же механизмом, например фосфорилированием особых белков (см. ниже). Без всякого сомнения, хромогликат подавляет выделение гистамина тучными клетками, которое индуцируется ионофором, но этот факт сам по себе не отрицает возможного наличия разных механизмов влияния хромогликата на транспорт кальция в тучных клетках и на некоторые другие биохимические события, относящиеся к потоку кальция и происходящие более дистально в секреторном механизме.

Тахифилаксия

При изучении хромогликата как ингибитора выделения гистамина тучными клетками отмечено, что препарат более эффективен при его использовании одновременно со стимулятором процесса. Данный факт не совсем обычен,

поскольку многим препаратам для проявления их максимального ингибиторного эффекта требуется предварительная инкубация с тканью. Для хромоглицата установлена обратная зависимость: сила подавления выделения гистамина уменьшается с увеличением времени преинкубации с препаратом перед добавлением стимулятора. Это также контрастирует с клиническими наблюдениями при использовании хромоглицата, который активен при введении за 2 и 18 ч до провокации бронхиальной астмы антигеном. На крысиных тучных клетках подавление хромоглицатом выделения гистамина уменьшается в пределах преинкубационного времени 0-10 мин. При внесении хромоглицата за 20 мин до стимуляции регистрируется лишь 75% эффекта, получаемого при внесении препарата одновременно со стимулом. При преинкубации клеток с препаратом более 20 мин ингибиторный эффект хромоглицата вновь возрастает. Таким образом, минимальный ингибиторный эффект наблюдается в промежутке преинкубационного времени 10-20 мин. Интересно, что точно такой же феномен наблюдается при использовании хромоглицата для подавления выделения гистамина из фрагментов легких крыс или при ингибировании пассивной кожной анафилаксии в коже крыс. Уменьшение ингибиторного действия хромоглицата при увеличении времени преинкубации с тканями перед стимуляцией не связано с захватом, метаболизмом или другой инактивацией препарата, поскольку дополнительное внесение препарата в момент стимуляции тканей не вызывает усиления ингибиторного эффекта или отмены тахифилаксии, вызванной преинкубацией. Тахифилаксия, индуцированная хромоглицатом, зависит и от концентрации препарата: более высокие концентрации вызывают и более сильную тахифилаксию.

После открытия хромоглицата было разработано множество препаратов, подавляющих выделение гистамина тучными клетками *in vitro* и пассивную кожную анафилаксию. Примером подобных соединений могут служить доксантразол и буфролин. Показано, что некоторые из этих соединений обладают перекрестной тахифилаксией с хромоглицатом, что указывает на общие механизмы их действия, а именно подавление выделения гистамина тучными клетками. Интересно, что флавоноид кверцетин, являющийся ингибитором выделения гистамина, также обнаруживает перекрестную тахифилаксию с хромоглицатом. К сожалению, эти препараты не обладают аналогич-

ной хромоглицату клинической антиастматической активностью. Это свидетельствует о том, что действие хромоглицата и данных веществ на тучные клетки крыс имеет мало общего с клинической эффективностью препарата.

Механизм тахифилаксии хромоглицата неясен; известно, однако, что она не обусловлена инактивацией препарата. Предполагается, что хромоглицат подавляет выделение гистамина, вызывая образование компонента, опосредующего ингибирование. В этом случае тахифилаксия должна отражать истощение этого эндогенного компонента, несмотря на присутствие препарата на его рецепторе. Одним из кандидатов на роль эндогенного компонента, образование которого вызывается хромоглицатом, является фосфорилированный белок (см. ниже); в таком случае тахифилаксия отражает автоматическую дефосфорилиацию белка в клетке в присутствии хромоглицата.

Влияние на транспорт кальция: хромоглицатсвязывающий белок

В настоящее время получены убедительные доказательства индукции выделения гистамина клетками под действием возрастающих концентраций ионизированного кальция в цитозоле после взаимодействия антигена с мембранным IgE (см. главу 2). Увеличение концентрации обеспечивается, по крайней мере частично, перемещением внеклеточного кальция во внутриклеточный отсек. Как полагают, кальций перемещается по мембранным каналам, которые открываются при взаимодействии антигена и IgE на поверхности мембраны. Одна из ранних гипотез о механизме действия хромоглицата заключается в том, что препарат предупреждает вход кальция в тучные клетки, стимулированные взаимодействием антиген-IgE. В качестве доказательства приводятся данные исследований, в которых хромоглицат предупреждает захват ⁴⁵Са тучными клетками, стимулированными взаимодействием антиген-IgE; причем активность препарата в отношении захвата ⁴⁵Са сравнима с активностью препарата как ингибитора секреции гистамина этими клетками.

В последующем было показано, что хромоглицат в органических растворителях образует комплексы с двухвалентными катионами, включая Mg, Ca, Sn, Ba, Zn и Mn. Эти комплексы образуются за счет электростатического взаимодействия двух карбоксильных групп хромоглицата с двумя положительными заря-

дами двухвалентных ионов со стехиометрией 1:1. Однако захват кальция хромоглицатом не объясняет его активности как ингибитора выделения гистамина по двум причинам: а) хромоглицат подавляет выделение гистамина в микромолярной концентрации в присутствии миллимолярной концентрации внеклеточного кальция; б) у тучных клеток, обработанных хромоглицатом, а затем отмытых от него, сохраняется подавление выделения гистамина. Показано, что хромоглицат подавляет выделение гистамина посредством механизма, включающего взаимодействие препарата и ионов кальция с мембранным белком. Для изучения связывания хромоглицата с базофильными лейкозными клетками крыс (RBL-2H3) препарат добавляли в нерастворимые матрицы бус. Связывание препарата специфично в отношении клеток RBL-2H3 и не определяется у клеток мастоцитомы P-815, не секретирующей гистамин, а также у тимоцитов. Удаление трипсином мембранного белка отменяет связывание хромоглицата с клетками RBL, как и связывание кальция с помощью EDTA. Следовательно, хромоглицат взаимодействует с мембранным белком на клетках RBL, для чего требуются ионы кальция. Связывание клеток и хромоглицата, конъюгированного с бусами, предупреждается свободным хромоглицатом, тогда как хромоглицат, конъюгированный с бусами, подавляет выделение гистамина из клеток в ответ на стимуляцию антиген-IgE.

Данные наблюдения свидетельствуют о наличии мембранного белкового рецептора для хромоглицата. Были предприняты попытки изолировать рецептор с помощью двух самостоятельных подходов, один из которых включает в себя аффинную хроматографию, а другой — иммунопреципитацию мембранного белка. В результате исследований получен белок с молекулярной массой 60 000, который специфичен для клеток RBL-2H3 и не выявляется на клетках мастоцитомы P-815 и тимоцитах. Свободный хромоглицат и EDTA предупреждают иммунопреципитацию белка антителами к хромоглицату. В ряде очень изящных экспериментов продемонстрирована функциональная значимость полученного белка. Некоторые варианты клеток линии RBL-2H3 несут IgE-рецепторы, но не выделяют гистамин в ответ на стимуляцию антиген-IgE. Эти варианты клеток секретируют гистамин при действии ионофора A23187, что указывает на сохранность секреторного механизма, который активируется повышением концентрации внутриклеточно-

го свободного кальция. Данные варианты клеток неспособны захватывать ^{45}Ca при стимуляции реакцией антиген-IgE на мембране, где не выявляется белок, связывающий хромоглицат. Поэтому был сделан вывод о том, что хромоглицатный рецептор мембраны представляет собой транспортный белок кальция, который необходим для выделения гистамина при стимуляции антиген-IgE. Соответственно хромоглицат подавляет выделение гистамина, нарушая транспортную функцию этого белка в отношении кальция.

Дополнительные подтверждения гипотезы о роли белка, связывающего хромоглицат, получены при слиянии очищенного хромоглицат-связывающего белка, заключенного в оболочку вируса Сендай, с вариантом клеток RBL-2H3, неспособных секретировать гистамин в ответ на стимуляцию реакцией антиген-IgE. Такое слияние с включением белка в дефектные клетки превращает их из неактивных в отвечающие на стимуляцию антиген-IgE. Кроме секреции гистамина в ответ на антигенную стимуляцию, варианты клетки становятся способными к захвату ^{45}Ca . Захват кальция и секреция гистамина в ответ на стимуляцию антиген-IgE пропорциональны количеству хромоглицатсвязывающего белка, внесенного в клетку, причем насыщение ответа достигается на уровне, соответствующем содержанию белка в нормальных отвечающих клетках RBL.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что белок, связывающий хромоглицат, является белком, переносящим кальций, который необходим для секреции гистамина клетками RBL, стимулированными взаимодействием антиген-IgE. Экспериментально выполнен следующий этап исследования: включение белка, связывающего хромоглицат, в липидный бислой индуцирует проводимость бислоя при его обработке антителами к белку. Антиген или анти-IgE подобным действием не обладает. Проводимость бислоя возникает при наличии Fc-рецептора и(или) одного связывающего белка, но в отсутствие антигена. Проводимость каналов, образуемых в двойном слое в результате перекрестного связывания Fc-рецепторов для IgE в присутствии хромоглицат-связывающего белка, составляет примерно 2pS , но «время открытия» слишком вариабельно для точного определения.

Эти очень изящные эксперименты направлены на определение наличия в мембранах клеток RBL белка, способного к формированию каналов. Более специфично белок взаимо-

действует с Fc-рецепторами для IgE, поскольку перекрестное связывание Fc-рецепторов антигеном активирует функцию кальциевых каналов. Однако при обсуждении данной модели необходимо сделать одну или две оговорки. Недавно при использовании метода быстрой фиксации не удалось выявить каких-либо каналов в мембранах интактных тучных клеток, стимулированных взаимодействием антиген-IgE. Возможно, каналы не обнаруживаются именно этим методом; не исключаются, однако, и иные объяснения, полученные на основании данных других экспериментальных работ (см. главу 2). Клетки RBL являются, кроме того, чистой линией, в которой идентифицирован белок, связывающий хромогликат, поэтому необходимо проведение подобных исследований на других клеточных линиях, таких как крысиные перитонеальные тучные клетки или (лучше) тучные клетки человека. По сравнению с тучными клетками крыс клетки RBL относительно нечувствительны к подавлению хромогликатом выделения гистамина, которое вызвано антиген-IgE; поэтому ряду исследователей не удалось получить подавление выделения гистамина хромогликатом на клетках RBL.

Фосфорилирование белков

Известно, что фосфорилирование белков играет основную роль в регуляции клеточных функций (см. главы 2, 3, 4). При стимуляции тучных клеток из перитонеальной полости крыс происходит фосфорилирование белков с молекулярной массой 68 000, 59000 и 42000; эти фосфорилированные белки участвуют в активации процесса секреции гистамина (см. главу 2). Белок тучных клеток с молекулярной массой 78 000 также подвергается фосфорилированию, но, вероятно, этот процесс связан с down-регуляцией секреции гистамина (см. главу 2).

Хромогликат вызывает фосфорилирование белка с молекулярной массой 78 000 при отсутствии любой стимуляции клеток. Кривая концентрация - эффект для хромогликатиндуцированного фосфорилирования совершенно идентична кривой для вызванного хромогликатом подавления выделения гистамина при стимуляции соединением 48/80. Если фосфорилирование данного белка связано с обратной регуляцией, то его фосфорилирование хромогликатом объясняет подавление секреции гистамина этим препаратом. Более того, индуцированное хромогликатом фосфорилирование

белка специфично в отношении белка с молекулярной массой 78000, а препарат одинаково эффективен как ингибитор секреции и как индуктор фосфорилирования при его введении одновременно со стимулятором тучных клеток (соединение 48/80). При обеих формах активности хромогликата (фосфорилирование и подавление секреции) выявлена тахифилаксия. Повторная экспозиция клеток с хромогликатом не вызывает фосфорилирования. Временные характеристики дефосфорилирования белка с молекулярной массой 78000 идентичны временным характеристикам потери чувствительности (тахифилаксия) тучных клеток к хромогликату при тестировании подавления выделения гистамина.

Фосфорилирование белка тучных клеток с молекулярной массой 78000 стимулируется и другими хромоном, отличающимися от хромогликата. Относительная активность хромонов как ингибиторов гистаминовой секреции соответствует их активности как индукторов фосфорилирования с молекулярной массой 78 000. Напротив, другие ингибиторы секреции гистамина, сальбутамол и дибутирил цАМФ, вызывающие фосфорилирование белка через цАМФ-зависимые протеинкиназы, не инициируют фосфорилирование белка тучных клеток с молекулярной массой 78 000. Таким образом, если индукция фосфорилирования является механизмом, с помощью которого хромогликат подавляет секрецию гистамина, то данный процесс не опосредуется цАМФ-зависимыми протеинкиназами. Показано, что дибутирил-и-8-бромочиклический ГМФ фосфорилируют белок с молекулярной массой 78 000 так же, как хромогликат, поэтому не исключено, что хромогликат может активировать цГМФ-зависимую протеинкиназу. В нескольких работах показано, что хромогликат и другие новые соединения с аналогичным механизмом действия являются ингибиторами фосфодиэстераз циклических нуклеотидов, но во всех случаях значения IC_{50} для хромогликата при подавлении фосфодиэстеразы были по крайней мере на 1 - 2 порядка выше IC_{50} при подавлении секреции гистамина. Одна из фосфодиэстераз тучных клеток обладает преимущественным сродством к цГМФ как к субстрату, а поскольку этот циклический нуклеотид фосфорилирует тот же белок, что и хромогликат, не исключено, что хромогликат может действовать (по крайней мере частично), предотвращая распад цГМФ.

В более поздних работах отмечалось, что протеинкиназа С фосфорилирует ряд белков

тучных клеток и клеток RBL (см. главу 2) и может быть мишенью для хромогликата. Белки, фосфорилированные киназой С, могут участвовать в активации и прекращении выделения гистамина; однако прямых доказательств изменения активности киназы С под действием хромогликата пока нет.

Гетерогенность тучных клеток: тканевая и видовая специфичность хромогликата

Тучные клетки играют ведущую роль в иммунопатологии различных аллергических и воспалительных заболеваний. Для глубокого понимания этих болезней необходимо учитывать, что тучные клетки различной локализации значительно различаются как по своим функциональным способностям, так и по структурным характеристикам (см. главу 2). В частности, тучные клетки различаются по своей реактивности в отношении секреторных стимулов и по чувствительности к определенным препаратам. Сейчас ясно, что реактивность тучных клеток разной локализации по отношению к определенным антиаллергическим агентам весьма вариабельна. Хромогликат является сильным ингибитором анафилактического выделения гистамина перитонеальными тучными клетками крыс; он умеренно эффективен в отношении тех же клеток у хомячков и совершенно неэффективен в отношении перитонеальных клеток мышей. Препарат также неэффективен в отношении человеческих базофильных лейкоцитов, легочных и мезентериальных тучных клеток морских свинок и интестинальных тучных клеток крыс. Конечно, отсутствие чувствительности клеток последнего типа резко контрастирует с высокой степенью реактивности серозных клеток данного вида.

Эффект хромогликата *in vitro* изучен в ряде других животных систем. Препарат обычно активен в отношении соединительнотканых тучных клеток крыс и (кроме цитированных исследований) подавляет выделение медиатора из размельченного легкого и срезов кожи данного вида животных. Результаты исследований на других животных системах не столь впечатляющие. Хромогликат не оказывает действия на выделение медиатора из фрагментов легкого коровы, собаки и морских свинок, а также из срезов кожи морских свинок и человека. Как уже отмечалось, препарат также неспособен подавлять кожные анафилактические реакции

in vivo у коров, обезьян, мышей и кроликов, что вполне соответствует отсутствию активности в отношении тучных клеток кожи животных этих видов. Кроме неспособности к подавлению выделения гистамина базофильными лейкоцитами человека, хромогликат неэффективен в отношении базофилов коров, морских свинок и кроликов. Таким образом, препарат обладает значительной тканевой специфичностью у конкретного вида животных; например, у крыс хромогликат активен в отношении соединительнотканых клеток, но не в отношении тучных клеток слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Препарат обладает подобной избирательностью для конкретной ткани у разных видов, однако в отношении тучных клеток кожи он активен только у крыс.

Ввиду использования хромогликата при бронхиальной астме у людей его действие на тучные клетки легких вызывает дополнительный интерес. Некоторое время считалось, что хромогликат в лучшем случае является слабым и непостоянным ингибитором выделения медиаторов фрагментами легочных тканей человека. Аналогичные результаты получены с тучными клетками энзиматически размельченных легочных тканей человека. Препарат максимально эффективен в отношении фрагментов легких обезьян только при субоптимальных концентрациях антигена. Все это привело к предположению об отсутствии связи клинической эффективности хромогликата при астме с его действием на тучные клетки. Тем не менее соединение обладает значительной активностью в отношении тучных клеток, полученных при бронхоальвеолярном лаваже у человека. В типичном случае такие клетки составляют 0,1-0,5% общей популяции ядродержащих клеток, полученных от здоровых людей. Интересно, что они обладают одинаковыми способностями к окрашиванию с тучными клетками слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта крыс. Эти клетки представляют собой более гомогенную популяцию, нежели популяция клеток, полученных при энзиматической обработке легочной паренхимы. Клетки из лаважа дозозависимо выделяют гистамин при стимуляции анти-IgE человека и не нуждаются в предварительной пассивной сенсибилизации. Таким образом, в норме они обладают значительным количеством подобных антител на клеточной поверхности и имеют рецепторы для данного изотипа. У больных бронхиальной астмой при лаваже определяется повышенное количество тучных клеток и эо-

зинофилов, что, возможно, указывает на активацию *in vivo* первых клеток и выделение хемотаксических факторов-вторыми. Более того, отмечается положительная корреляция между числом полученных тучных клеток и тяжестью заболевания, определяемого индексами обструкции воздушного потока. Бронхоальвеолярные клетки больных астмой значительно более чувствительны к стимуляции анти-IgE и выделяют гораздо больший процент общего гистамина при всех эффективных дозах антисыворотки. Это усиление ответа относится лишь к клеткам легких, а для базофилов периферической крови больных астмой и здоровых людей не выявлено разницы в индуцированной анти-IgE секреции гистамина. Клетки из лаважной жидкости аллергических доноров выделяют гистамин и при использовании специфического антигена.

Эти данные имеют клиническое значение, поскольку лаважные клетки локализируются в дыхательных путях или альвеолах (или в непосредственной близости от них). Таким образом, они легко и немедленно вступают в контакт с вдыхаемым антигеном, а при активации выделяют медиаторы непосредственно на поверхность дыхательных путей. Ввиду этого они могут представлять собой тип тучных клеток, имеющих первичное значение в начальном патогенезе астмы человека. Более того, ввиду их поверхностной локализации в дыхательных путях лаважные клетки подвергаются наибольшему воздействию хромогликата *in vivo*. Дополнительное значение имеет повышенная чувствительность данных клеток к препарату по сравнению с паренхиматозными тучными клетками. Однако необходимо помнить и о чрезвычайной трудности соотнесения активности в препаратах *in vitro* и *in vivo*. В практических целях эксперименты *in vitro* обычно проводятся таким образом, чтобы обеспечить получение 30% (или более) подавления секреции гистамина от его общего содержания в клетке. Однако часть гистамина, выделяемого *in vivo* даже во время наиболее сильного приступа, вероятно, гораздо меньше этого значения. Хорошо известно, что эффекты хромогликата и других

подобных препаратов значительно варьируют и находятся в обратной зависимости от силы секреторного стимула. Таким образом, хромон может представлять собой более чем сильный ингибитор секреции гистамина бронхоальвеолярными клетками *in vivo* при обычном в клинических ситуациях уровне секреции. Вероятно, что использование препарата связано, по крайней мере частично, и с этим действием.

Разнообразие чувствительности к препарату наглядно показывает сложности, существующие при подборе тест-системы для скрининга потенциальных противоаллергических препаратов. Более того, если такие препараты проявят тканевую специфичность, сходную с хромогликатом, который, например, активен в отношении бронхоальвеолярных, но не кожных тучных клеток человека, то вряд ли какое-то одно соединение станет панацеей при всех аллергических нарушениях. Необходим целый ряд препаратов, направленных как на особые тучные клетки, так и на специфические болезненные состояния.

Р.Дж. Флауэр, М.М. Дейл (R.J. Flower, M.M. Dale)

Кортикостероиды- природные гормоны

Кортикостероиды-это гормоны, секретируемые корой надпочечников. Они классифицируются как глюкокортикоиды, влияющие на углеводный и белковый обмен и обладающие противовоспалительными эффектами, и минералокортикоиды, играющие важную роль в водном и электролитном балансе. В данной главе рассматриваются глюкокортикоиды.

К основным природным глюкокортикоидам относятся кортизол (гидрокортизон) и кортикостерон. Кортизол намного активнее кортикостерона и составляет 90% всех кортикостероидов, вырабатываемых в организме человека; у животных могут преобладать другие глюкокортикоиды.

Уровень кортизола в плазме составляет 4- 16 мкг/100 мл; отмечаются суточные колебания его концентрации: максимум - примерно в 8ч утра и минимум - около 16 ч. Для достижения противовоспалительного эффекта необходима концентрация примерно 100 мкг/100 мл.

Эндогенные глюкокортикоиды не циркулируют в плазме в свободной форме. В плазме крови содержится кортикостероидсвязывающий глобулин, который вместе с альбумином связывает примерно 90% общего количества плазменных глюкокортикоидов. Функция этого белка изучена не полностью, однако известно, что его содержание в крови меняется при заболеваниях, беременности и других состояниях.

Глюкокортикоиды не хранятся в готовом виде, а синтезируются и выделяются при стимуляции клеток коры надпочечников кортикотропином, пептидным гормоном передней доли гипофиза.

Выделение кортикотропина регулируется кортикотропин-рилизинг-фактором гипоталамуса (КРФ), а глюкокортикоиды по механизму отрицательной обратной связи оказывают влияние на высвобождение этих двух гормонов (рис. 104).

246

Влияние глюкокортикоидов на системы организма

По своей значимости эффекты глюкокортикоидов могут быть разделены на две категории: 1) противовоспалительные и иммунодепрессивные; 2) метаболические и опосредованные гипоталамусом и передним гипофизом эффекты обратной негативной связи, а также некоторые другие. При физиологическом выделении глюкокортикоидов в условиях целостного организма все эти эффекты обеспечивают выживание, особенно в условиях, угрожающих жизни. Те же эффекты необходимы при проведении заместительной терапии в случае недостаточной функции коры надпочечников. Однако при использовании глюкокортикоидов в качестве противовоспалительных препаратов все эффекты, кроме противовоспалительных, считаются побочными и нежелательными.

Разнообразие биологических эффектов глюкокортикоидов может, на первый взгляд, вызывать недоумение, но недавно была предложена гипотеза, объясняющая это положение. Идея, выдвинутая Munck и соавт. в 1984 г., предполагает, что глюкокортикоиды секретируются для предотвращения выхода из-под контроля защитных механизмов организма, которые активизируются при заболевании и способны нарушать гомеостаз. Под защитными механизмами Munck подразумевает такие реакции на травму и заболевание, как воспаление, лихорадка, боль и др.

Другими словами, глюкокортикоиды составляют часть регуляторных механизмов, контролирующих реакции воспаления, и находятся в состоянии тонической активности у здоровых млекопитающих. При лечении больных экзогенными стероидами уровень гормонального подавления защитных механизмов возрастает почти до максимального значения.

Противовоспалительное действие глюкокортикоидов

В течение многих лет наши представления о функции глюкокортикоидов в организме бы-

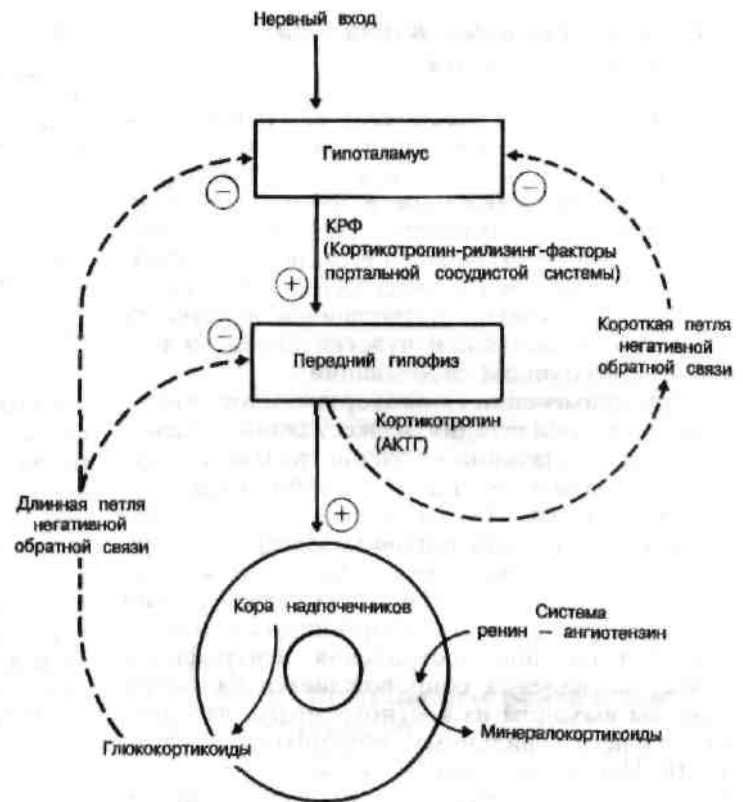


Рис. 104. Регуляция синтеза и выделения кортикостероидов гормонами переднего гипофиза и гипоталамуса. Знак плюс — стимулирующий эффект; знак минус — тормозящий эффект.

ли довольно туманными. С 30-х годов известно, что у человека и животных при стрессе, травмах и инфекциях в крови обязательно повышается уровень стероидов. Известный австрийский физиолог Ганс Селье объяснял эту реакцию защитным механизмом и считал, что стероиды так или иначе поддерживают воспаление¹. Селье выделил много различных физиологических реакций на стресс, отметил их стереотипность и назвал их комплекс «общим адаптационным синдромом».

Идея Селье длительное время оказывала и продолжает оказывать влияние на наше мышление, однако данные, полученные вскоре после второй мировой войны, внесли некоторые сомнения относительно оценки роли стероидов. Американский врач Phillip Hench обнаружил, что у женщин, страдающих артритом,

часто наступает стойкая ремиссия во время беременности, а также при желтухе. Известно, что при беременности в крови наблюдается резкий подъем уровня глюкокортикоидов, поэтому Hench высказал догадку, что именно эти гормоны обладают противовоспалительным действием. Данная работа по времени совпала с получением синтетического кортизола, благодаря чему Hench смог с успехом применить гормон у больных ревматоидным артритом и другими хроническими воспалительными заболеваниями. Эта работа заложила основу современной глюкокортикоидной терапии. Сейчас известно, что препараты данной группы исключительно эффективны практически при всех воспалительных заболеваниях независимо от их причинных факторов. Противовоспалительные стероиды (кортизол и его синтетические аналоги) относятся к наиболее часто назначаемым лекарственным препаратам, но, к сожалению, их терапевтическая ценность при воспалительных заболеваниях снижается, так как их длительное применение чревато развитием побочных эффектов.

¹ Было бы ошибкой относить воспаление к патологическим процессам. Без адекватной способности к воспалительной реакции организм не может противостоять инфекции и восстанавливать ткани после травмы.

Уровни подавления воспаления глюкокортикоидами

Глюкокортикоиды подавляют как ранние, так и поздние проявления острого воспаления-покраснение, жар, боль, отек, а также последующие процессы репарации и заживления ран. Они подавляют воспаление любого типа вне зависимости от вызвавшей его причины: внедрившийся патоген, физический или химический стимул, неадекватно развившийся иммунный ответ при повышенной чувствительности или при аутоиммунном заболевании.

При применении глюкокортикоидов уменьшаются вазодилатация и экссудация. Уменьшение вазодилатации частично связано с сосудосуживающим действием на небольшие кровеносные сосуды. Особенно заметно сокращение накопления лейкоцитов (как нейтрофилов, так и моноцитов) в месте воспаления, что, вероятно, является одной из основных причин снижения резистентности организма к инфекции. Уменьшение поступления нейтрофилов в зону воспаления сопровождается их повышенным выходом из костного мозга, что приводит к нейтрофильному лейкоцитозу (см. главу 20). Напротив, уменьшение выхода моноцитов из костного мозга приводит к снижению их количества в крови. Мононуклеарные фагоциты менее активны против бактерий; отмечается также ослабление секреции нейтральных протеаз. Снижается активность фибробластов, которые продуцируют меньшие количества коллагена и мукополисахаридов.

Действие глюкокортикоидов на лимфоциты зависит от вида животных. У видов, чувствительных к стероидам (кролики, крысы, мыши), глюкокортикоиды вызывают лимфолизис, который приводит к уменьшению количества Т- и В-клеток и их продуктов. У резистентных видов (люди, обезьяны, морские свинки) лимфолизис или отсутствует, или бывает незначительным. Однако в системах определения *in vitro* обнаруживается ослабление пролиферативной реакции на митогены и антигены, что связано со снижением образования интерлейкина-2 (ростовой фактор Т-клеток). В таком случае влияние глюкокортикоидов на первичный иммунный ответ выражено сильнее, чем на вторичный, поскольку клональная экспансия клеток при вторичном ответе уже снижена в результате уменьшенной продукции интерлейкина-2 (см. рис. 4).

В табл. 24 приведен список медиаторов воспаления, синтез которых нарушается под дей-

Таблица 24. Некоторые медиаторы воспаления, синтез или действие которых снижается глюкокортикоидами

Интерферон
Интерлейкин-1
Интерлейкин-2
Субстанции, стимулирующие естественные киллеры
Простагландины
Лейкотриены
Брадикинин
Фактор активации тромбоцитов
Гистамин
Нейтральные протеазы

ствием глюкокортикоидов. Они также снижают поступление лимфоцитов в область клеточ-но-опосредованных иммунных реакций. Кроме того, уменьшается активность макрофагов, что отчасти связано с сокращением продукции лимфокинов, а также с понижением их чувствительности к действию лимфокинов. В результате начинается неконтролируемый рост туберкулезных бацилл и других микроорганизмов, которые в норме сдерживаются макрофагами, активированными лимфокинами.

Влияние глюкокортикоидов на воспалительную реакцию в одном из ее аспектов изучено особенно хорошо и будет описано ниже.

Влияние глюкокортикоидов на обменные процессы и его связь с побочными эффектами

Глюкокортикоиды оказывают сильное влияние на метаболизм углеводов, уменьшая захват и утилизацию глюкозы, а также увеличивая глюконеогенез и отложение гликогена. Результирующим действием гормонов является тенденция к повышению уровня сахара в крови. Под действием глюкокортикоидов снижается синтез белка и усиливается их метаболизм, что приводит к отрицательному азотному балансу. В жировом обмене отмечается усиление липолиза за счет «пермиссивного» влияния на действие других липолитических гормонов. Вообще, роль глюкокортикоидов заключается в поддержании гомеостаза глюкозы за счет привлечения различных субстратов, таких как гликоген, белок и жиры.

Глюкокортикоиды обладают и некоторым влиянием на водный и электролитный баланс. Кроме того, они имеют важное значение в поддержании целостности мышечной, сердечно-сосудистой и центральной нервной систем.

Хотя системные метаболические эффекты

не имеют отношения к противовоспалительному действию глюкокортикоидов, их понимание необходимо для оценки побочных эффектов препаратов (см. ниже).

Глюкокортикоидные препараты, содержащие синтетические производные гидрокортизона

Кортикостероиды, образующиеся в коре надпочечников, обладают широким спектром активности — от минералокортикоидной, с одной стороны, до глюкокортикоидной — с другой. Так, альдостерон, главный эндогенный минералокортикоид, вызывает сильную задержку натрия в почках, но также оказывает некоторое влияние на метаболизм углеводов. Кортизол, основной глюкокортикоид, обладает очень сильным противовоспалительным действием и влияет на углеводный обмен; вместе с тем он проявляет и некоторую минералокортикоидную активность. При получении синтетических стероидов усилия были направлены на разделение противовоспалительных и минералокортикоидных эффектов. В табл. 25 приведены сравнительные данные о минералокортикоидной и глюкокортикоидной активности различных кортикостероидов, причем в качестве стандарта принята активность кортизола.

Другой задачей при разработке синтетиче-

ских аналогов гидрокортизона (в отличие от обычных попыток получения новых патентованных средств) является увеличение длительности их действия. Совершенно очевидно (см. табл. 25), что период полураспада гидрокортизона очень короток и продолжительность действия некоторых его синтетических аналогов значительно его превышает. Это было достигнуто благодаря синтезу производных гидрокортизона (часто фторированных), которые обладают повышенным связыванием с рецептором (см. ниже), пониженным метаболизмом в организме и не связываются кортикостероид-связывающим белком.

Совершенно очевидно, что эти сильные синтетические соединения обладают рядом преимуществ, связанных с удобством дозирования, быстротой и длительностью терапевтического действия. Однако указанные преимущества нередко нивелируются побочными эффектами, также более выраженными, чем у природного гормона.

Опасность длительного применения глюкокортикоидов

В терапии глюкокортикоиды применяются в основном для получения противовоспалительных и иммуносупрессивных эффектов. Они применяются в трансплантационной хирургии,

Таблица 25. Сравнительная активность природных и синтетических стероидов (в качестве стандарта принята активность гидрокортизона)

Соединение	Обычное содержание в таблетке, мг	Относительная активность		Относительный аффинитет к рецептору	Продолжительность действия (время полураспада, ч)
		противовоспалительная	задержка натрия		
Гидрокортизон (кортизол)	20	1	1	1	8–12
Кортизон ^a	25	0,8	1	0,01	8–12
Кортикостерон	—	0,3	15	0,85	8–12
Преднизолон	5	4	0,8	2,2	12–36
Преднизон ^a	5	4	0,8	0,05	12–36
Метилпреднизолон	4	5	Минимальная	11,9	12–36
Триамцинолон	4	5	Нет	1,9	12–36
Дексаметазон	0,5	30	Минимальная	7,1	36–72
Бетаметазон	0,5	30	Ничтожная	5,4	36–72
Параметазон	2	10	Ничтожная	—	36–72
Дезоксикортон	—	Ничтожная	50 ^b	—	—
Флудрокортизон	0,1	5	150	—	8–12
Альдостерон	—	Нет	500 ^b	—	—

Неактивен; в активную форму переходит в организме.

Сублингвальное введение.

Инъекция.

Таблица 26. Побочные эффекты длительной терапии глюкокортикоидами

Горб буйвола
 Лунообразное лицо
 Повышенная кровоточивость (экхимозы)
 Гипертензия
 Остеопороз
 Мышечная слабость
 Пониженная резистентность к инфекциям
 Истончение кожи
 Глаукома

а также при лечении заболеваний, при которых происходит неадекватное развитие иммунных реакций (аутоиммунные заболевания и различные формы гиперсенситивности). Это очень ценные препараты, порой даже спасающие жизнь. Однако при назначении глюкокортикоидов как противовоспалительных препаратов следует помнить, что они подавляют проявления воспаления, не устраняя его причины. Нормальная биологическая реакция на интеркуррентные инфекции также подавляется, поэтому активизируются латентные инфекции, например туберкулез.

В современных синтетических препаратах успешно разделены минералокортикоидная и глюкокортикоидная активность, поэтому некоторые глюкокортикоиды практически не обладают минералокортикоидной активностью.

Отделение противовоспалительной активности от метаболических эффектов оказалось безуспешным, поэтому использование глюкокортикоидов как противовоспалительных препаратов, особенно в течение длительного времени, чревато возникновением выраженного влияния на обмен углеводов, белков и жиров, а также подавлением активности системы гипоталамус - гипофиз - надпочечники. Резкое прекращение терапии чревато появлением у больного состояния адренорезистентной недостаточности.

Переносимость кратковременной терапии даже высокими дозами в целом великолепна. Проблемы возникают при хроническом лечении. Помимо пониженной резистентности к инфекции, которая вызывается тем же подавлением функции лейкоцитов (что лежит в основе большинства противовоспалительных эффектов), они включают нарушения метаболизма, составляющие классический синдром побочных эффектов глюкокортикоидов (табл. 26).

Внутриклеточные рецепторы глюкокортикоидов

В настоящее время хорошо известно, что подавляющее большинство (а возможно, и все) биологических эффектов глюкокортикоидов, имеющих эндогенное происхождение или введенных экзогенно, опосредуется сложным рядом событий, возникающих при связывании гормонов со специфическими внутриклеточными рецепторами.

Клетки большинства тканей организма обладают внутриклеточными стероидными рецепторами. Они представляют собой асимметричные белки с молекулярной массой 30000-50000 дальтон. Плотность рецепторов составляет от 3000 до 100000 на клетку; рецепторы высокоаффинны, константа диссоциации - 0,1-10 нМ. Стероиды легко проникают в клетку, и их взаимодействие с рецепторами приводит к изменению конформации рецептора, в результате чего открываются места связывания для ядерного материала. Рецептор состоит из двух субъединиц, участвующих в связывании стероидов. Одна субъединица несет также место связывания с белком хроматина, а другая - с ДНК. Комплекс движется в ядро и взаимодействует со специфическими контролируемыми местами на чувствительных к стероидам генах, ускоряя или замедляя транскрипцию гена. В первом случае увеличивается синтез соответствующей информационной РНК, что приводит к повышению синтеза специфических белков. Эти белки представляют собой медиаторы эффектов стероидов (рис. 105). После взаимодействия комплекс рецептор - стероид диссоциирует вне ядра, а рецептор регенерирует. Предполагается, что стероиды, помимо транскрипционного контроля, описанного выше, осуществляют посттранскрипционный контроль, однако конкретных данных, свидетельствующих в пользу его существования, пока слишком мало. В большинстве же эффектов отрицательной обратной связи стероидов с гипоталамусом транскрипция, по-видимому, не вовлекается.

Участие синтеза информационной РНК и белка во многих эффектах стероидов становится очевидным при блокаде этих эффектов ингибиторами синтеза РНК и белка (актиномицином D и циклогексимидом). Также ясно, что глюкокортикоиды индуцируют ферменты не только *in vitro*, но и *in vivo*. Это может служить основой объяснения некоторых обменных эф-

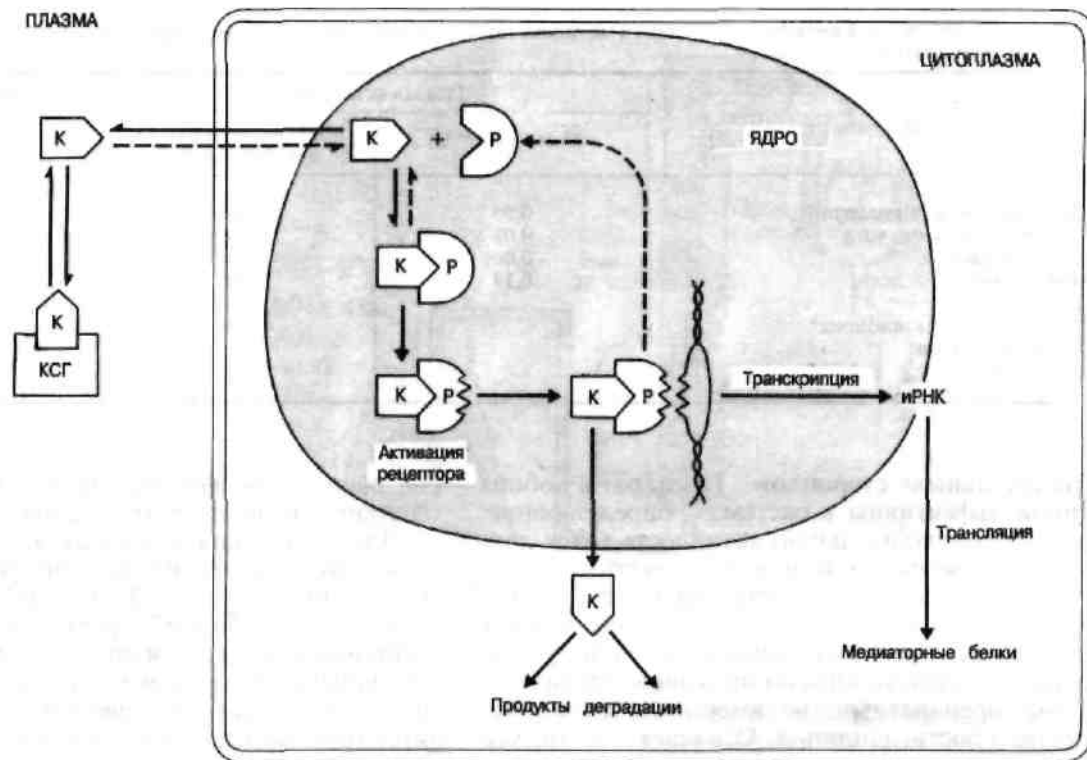


Рис. 105. Механизм действия глюкокортикоидов на внутриклеточные рецепторы.

КСГ - кортикостероидсвязывающий глобулин (в плазме); К - кортикостероид; Р - рецептор; мРНК - информационная рибонуклеиновая кислота.

эффектов глюкокортикоидов, хотя известной индукцией ферментов не объясняются все вызванные метаболические изменения.

Аспириноподобное действие глюкокортикоидов

Ко времени написания книги невозможно было дать полное объяснение противовоспалительного действия глюкокортикоидов, оказывающих влияние на воспаление на различных уровнях. Но по крайней мере некоторые их эффекты можно объяснить действием на фермент, встроенный в мембрану и называемый фосфолипазой A_2 .

Исследование, приведшее к этому выводу, было предпринято в начале 70-х годов. Открытие угнетения биосинтеза простагландинов аспириноподобными препаратами (см. главу 25) побудило к изучению влияния других типов препаратов на образование простагландинов.

Предполагалось, что если фармакологическая активность аспириноподобных препаратов связана со способностью блокировать биосинтез простагландинов, то и другие противовоспалительные препараты могут иметь подобный механизм действия.

Интерес многих исследователей был привлечен к стероидам. При расшифровке механизма действия аспириноподобных препаратов было обнаружено, что стероидные противовоспалительные препараты не действуют на микросомную циклооксигеназу даже при очень высоких концентрациях. Однако стероидные препараты проявляют ряд эффектов аспириноподобных препаратов, которые, вероятно, связаны с угнетением биосинтеза простагландинов; поэтому сохранялось предположение о вмешательстве стероидов в обмен простагландинов. В табл. 27 сравнивается антициклооксигеназная активность четырех аспириноподобных препаратов и четырех противо-

Таблица 27. Различия в антиферментативной активности стероидных (звездочка) и аспириноподобных противовоспалительных препаратов

Препарат	Циклооксигеназа		ЕД ₅₀ , мг/кг (отек лапы у крыс)
	IC ₅₀ , мкг/мл	процент подавления при 100 мкг/мл	
Меклофенамовая кислота	0,03	100	15
Нифлуминовая кислота	0,03	100	47
Индометацин	0,06	100	6
Мефенамовая кислота	0,17	100	68
Дексаметазон*	-	10	<0,001
Ацетонид триамсинолона*	-	0	0,08
Флудрокортизон*	-	5	0,15
Гидрокортизон*	-	3	13

спалительных стероидов. Препараты обоих типов эффективны в системах, определяющих противовоспалительную активность (отек лапки крыс), но циклооксигеназу блокируют только аспириноподобные препараты. В связи с этими данными возникает и теоретическая проблема, поскольку непонятно, почему стероиды, будучи мощными противовоспалительными препаратами, не вмешиваются в биосинтез простагландинов. Означает ли это, что они имеют совершенно иной механизм действия? Или же простагландины не играют важной роли в воспалении? В ряде работ, опубликованных в начале и середине 70-х годов, убедительно показано, что стероиды способны блокировать образование простагландинов, хотя и при помощи механизма действия, отличного от аспириноподобных веществ.

Gryglewski и его сотрудники обнаружили, что кортикостероиды, гидрокортизон и дексаметазон предупреждают вызванное норадреналином выделение простагландинов в перфузируемых мезентериальных сосудах кроликов, а также антигениндуцированное выделение простагландинов в перфузируемых легких морских свинок. Прямое превращение арахидоновой кислоты стероидами в этих моделях не блокировалось, поэтому место блока не связано ни с циклооксигеназой, ни с «механизмами выделения». Действительно, исследователи пришли к заключению, что кортикостероиды действуют посредством ограничения доступности субстрата. Эта точка зрения вскоре получила подтверждение в ряде исследований. В изящных экспериментальных работах, опубликованных в 1976 и 1977 гг. Levin и его группа, используя культуры клеток, меченных арахидоновой кислотой, содержащей тритий, смогли продемонстрировать подавление

распада фосфолипидов и, следовательно, угнетение выделения арахидоната.

Для понимания этого факта следует вспомнить, что простагландины образуются из арахидоновой кислоты. В большинстве клеток количество свободной арахидоновой кислоты очень невелико, хотя в виде различных эфиров она присутствует в высоких концентрациях. Поскольку простагландины в клетке не хранятся (они выделяются немедленно после синтеза), фактором, лимитирующим скорость их биосинтеза, является доступность субстрата. Одной из начальных стадий формирования простагландинов является выделение из пула эфиров субстрата-арахидоновой кислоты. Наибольшее доверие внушает, гипотеза, согласно которой главным источником арахидоновой кислоты служат фосфолипиды, а фермент, необходимый для выделения субстрата, является фосфолипазой А₂.

Подавление глюкокортикоидами фосфолипазы А₂ в перфорируемом легком морских свинок

Перфузируемые легкие морских свинок наряду с множеством других систем биологического определения уже многие годы остаются излюбленным инструментом изучения образования и выделения простагландинов (рис. 106). Идея метода определения крайне проста. Оксигенированный раствор Кребса при температуре 37°C перфузируется со скоростью 5-10 мл/мин через легочную артерию изолированного легкого морских свинок. Содержимое легочных вен направляется на ткани, выбранные для биологической оценки. Для определения простагландиновых эндоперекисей пред-

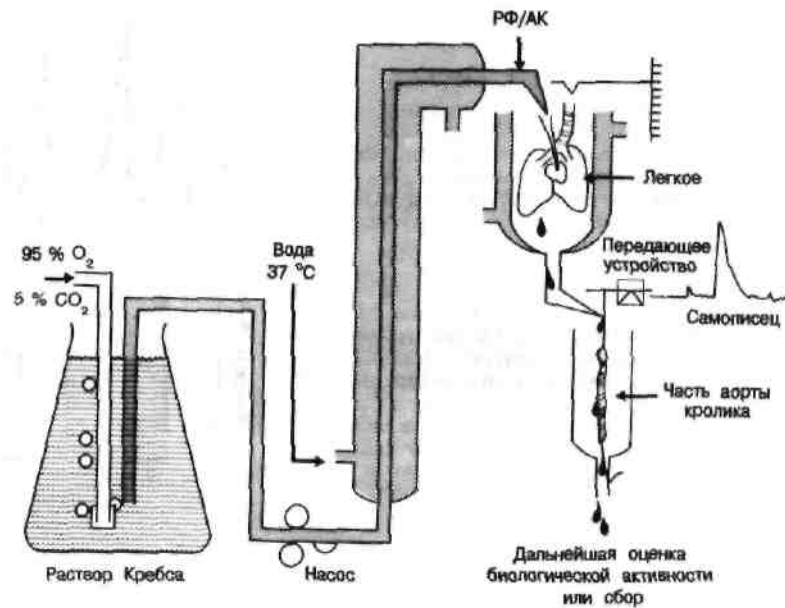


Рис. 106. Экспериментальная установка для перфузии изолированных легких морских свинок.

Раствор Кребса направляется насосом через канюлю в легочной артерии. Рилизинг-фактор (РФ) или арахидоновая кислота (АК) может вводиться в канюлю, что вызывает выделение простагландинов.

почтение обычно отдается полоскам аорты кроликов, полоскам желудка крыс, толстой кишке крыс, трахее морских свинок и прямой кишке цыплят. Специфичность тканей к простагландиновым метаболитам можно повысить введением в венозный отток антагонистов других веществ, вызывающих сокращение гладких мышц.

В 1976 г. этот метод был использован для определения активности рилизинг-фактора, вещества, вызывающего сокращение аорты кролика (ВСАК-РФ, или просто РФ), - низкомолекулярной части экстракта, полученного при перфузии легких, стимулированных антигеном. Как показано на рис. 106, введение в легочную артерию РФ приводит к выделению легкими веществ, вызывающих сокращение гладких мышц, которые идентифицируются различными биологическими и другими методами как смесь простагландиновых эндоперекисей и тромбоксана А₂. Индометацин и другие аспириноподобные вещества подавляют образование этих веществ. Но при изучении ингибиторной активности препаратов других типов обнаружено, что противовоспалительный стероид дексаметазон предупреждает действие РФ, но не подавляет превращение легкими арахидоновой кислоты в простагландино-вые продукты (рис. 107).

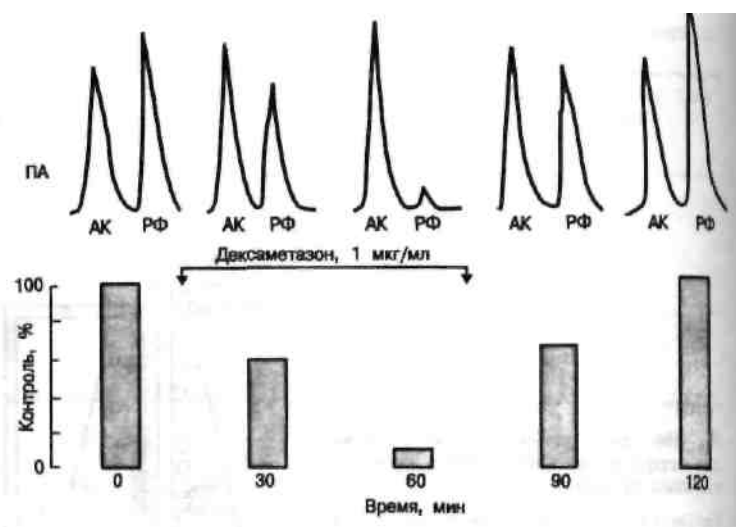
Отсутствие влияния дексаметазона на превращение арахидоновой кислоты легкими чет-

ко свидетельствует об отсутствии ингибиторного действия препарата на циклооксигеназу. При исследовании других стероидов вскоре было установлено, что почти все противовоспалительные глюкокортикоиды эффективны в отношении РФ-индуцированного выделения, а также в отношении выделения, вызванного гистамином и 5-окситриптамином. Более того, их ранжирование по активности в отношении РФ совпадало с ранжированием по противовоспалительной активности. Половые гормоны и альдостерон в данной системе не активны.

В отличие от ацетилсалициловой кислоты или индометацина при действии стероидов на перфузируемые легкие всегда наблюдается латентный период 15-30 мин.

Как и где действуют стероиды? Если арахидоновая кислота вводится в легочную артерию перфузируемого легкого морских свинок, она немедленно переходит в окисислоты и продукты превращения простагландиновых эндоперекисей. Из этого был сделан вывод о том, что доступность субстрата (арахидоновой кислоты) является важным фактором, ограничивающим скорость образования простагландинов при использовании данного метода. В этом случае высвобождающие вещества (такие как РФ) действуют, выделяя субстрат из внутриклеточных депо. Эту гипотезу проверили, измерив выделение простагландинов

Рис. 107. Определение биологической активности эффуента перфузируемых легких морской свинки с помощью полоски аорты (ПА) кролика показывает превращение арахидоновой кислоты (АК) в продукты простагландинов, обладающих контрактильной активностью по отношению к гладким мышцам, и образование этих продуктов после введения ФРСАО-3Ф (РФ). Действие РФ дозозависимо блокируется дексаметазоном, вводимым в легочную артерию. На нижней гистограмме показан стандартный способ графического отображения полученной биологической оценки в виде отношения между реакциями на РФ и АК (этот метод используется дальше по тексту).



легкими после введения различных веществ. В каждом случае введение РФ вызывало выделение арахидоновой кислоты. При введении в перфузат стероиды блокировали этот эффект, но через 30-40 мин после прекращения инфузии стероидов он восстанавливался.

Вполне вероятно, что противовоспалительные стероиды каким-то образом предупреждают выделение субстрата из внутриклеточного липидного депо. Но из какого? В селезенке и тромбоцитах большая часть арахидоновой кислоты, используемой для биосинтеза простагландинов, относится к фосфатидной фракции. Концептуальным достижением в признании фракции фосфатидов в качестве источника арахидоната является то, что это позволяет легко объяснить способность множества событий, связанных с мембраной, запускать образование простагландинов. Если клеточным источником арахидоната является пул фосфатидов, то из этого следует, что фосфолипаза A_2 выполняет важную роль. В конкретной ситуации в отношении арахидоновой кислоты, которая в основном этерифицируется в позиции 2', фосфолипаза A_2 является гидролитическим ферментом.

Стимулируют ли фосфолипазу вещества, выделяющие простагландины? И если это так, то является ли данный ферментативный этап чувствительным к стероидам? Для ответа на эти вопросы был использован метод определения фосфолипазной активности в перфузируемых легких. Этот метод зависит от метаболизма специфических меченых фосфатидов

в легких. Фоновая фосфолипазная активность легких блокируется рядом препаратов, включая мепакрин (известный ингибитор фосфолипазы); ацетилсалициловая кислота и индометацин практически неэффективны против этого фермента. Глюкокортикоиды - бетаметазон, дексаметазон и гидрокортизон - проявляют себя как очень активные ингибиторы в отличие от минералокортикоида альдостерона.

Стероиды в отличие от мепакрина не влияют на активность фосфолипазы A_2 в бесклеточных гомогенатах, причем подавление отличается от такового, вызываемого нестероидами, и по временным параметрам. На рис. 108 представлены результаты эксперимента, в котором гидролиз фосфатидов измеряли каждые 10 мин до начала, во время и после инфузии дексаметазона. Перед инфузией стероидов фоновый гидролиз возрастал, а вскоре после добавления стероидов гидролиз стал замедляться и спустя 50 мин полностью прекратился. После прекращения инфузии скорость гидролиза начала возрастать и достигла контрольного уровня через 40-50 мин.

Фоновая фосфолипазная активность может стимулироваться или подавляться. Активация фермента и фонового гидролиза осуществляется различными веществами. Стимулирующая фосфолипазу активность гистамина, РФ и антигена дозозависимо блокируется мепакрином и стероидами.

Показано, что противовоспалительные стероиды отменяют выделение тромбоксанов за счет предупреждения мобилизации арахидоно-

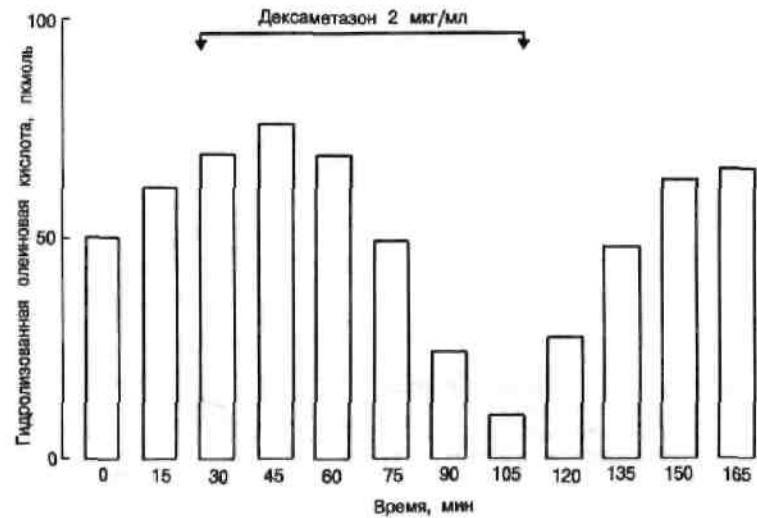


Рис. 108. Подавление фосфолипаза- A_2 -подобной активности легких дексаметазоном.

вой кислоты, вторичной по отношению к активации фосфолипазы. Как это достигается? И почему стероиды действуют только на интактные клетки?

Индукция синтеза глюкокортикоидами белкового ингибитора фосфолипазы A_2

Как отмечалось выше, для проявления большинства эффектов стероидов необходимо связывание препарата с цитозольным рецепторным белком. Комплекс препарат-рецептор затем переносится в ядро, где начинается цепь событий, приводящих к биологическому эффекту. Подобная ситуация наблюдается в легких; было показано, что легкие морских свинок содержат белковые растворимые глюкокортикоидные рецепторы, способные к связыванию [3H]-дексаметазона. Интересно, что кортексолон, аналог глюкокортикоидов, предупреждает связывание дексаметазона с рецептором в данной системе, подавляя тем самым действие дексаметазона не менее эффективно, чем это наблюдается при введении ингибиторов синтеза РНК (актиномицина D), синтеза белка (пурамицина) или обоих (циклогексимид). Эти данные четко свидетельствуют о том, что (несмотря на короткий латентный период действия) стероиды вызывают антифосфолипазный эффект, индуцируя транскрипцию и трансляцию в легочных клетках-мишенях.

Одним из возможных объяснений этого может служить предположение, что стероиды инициируют синтез *de novo* (или секрецию)

антифосфолипазного фактора. В ряде последующих экспериментов были получены весо-мые доказательства этой гипотезы. Легкие морских свинок перфузировали в разных условиях (рис. 109, а). Перфузат из одного легкого (называемого легкое-генератор) реоксигенировали и подавали насосом в другое легкое (тест-легкое), получавшее также циклогексимид для подавления чувствительности к стероидам. Противовоспалительные стероиды вводили либо через легкое-генератор, либо прямо в перфузат (минуя генераторное легкое). Таким образом, единственная разница между перфузатами тест-легкого заключалась в прохождении (или непрохождении) стероидов через первое легкое. Для определения фосфолипазной активности проводился биологический или радиоиммунологический анализ.

Если стероиды инфузирвали прямо в тест-легкое, они не влияли на фосфолипазную активность, но при их введении в легкое-генератор отмечалось существенное снижение фосфолипазной активности тест-легкого. Сходные результаты были получены, когда стероиды вводили сначала в легкое-генератор, после чего легкие меняли местами. В этом случае подавленный фосфолипидный гидролиз на РФ восстанавливался, когда стероиды добавляли к тест-легкому.

Эти и подобные им эксперименты убедительно продемонстрировали высвобождение под действием стероидов некоторыми типами клеток легких сильного ингибитора фосфолипазозависимого биосинтеза простагландинов.

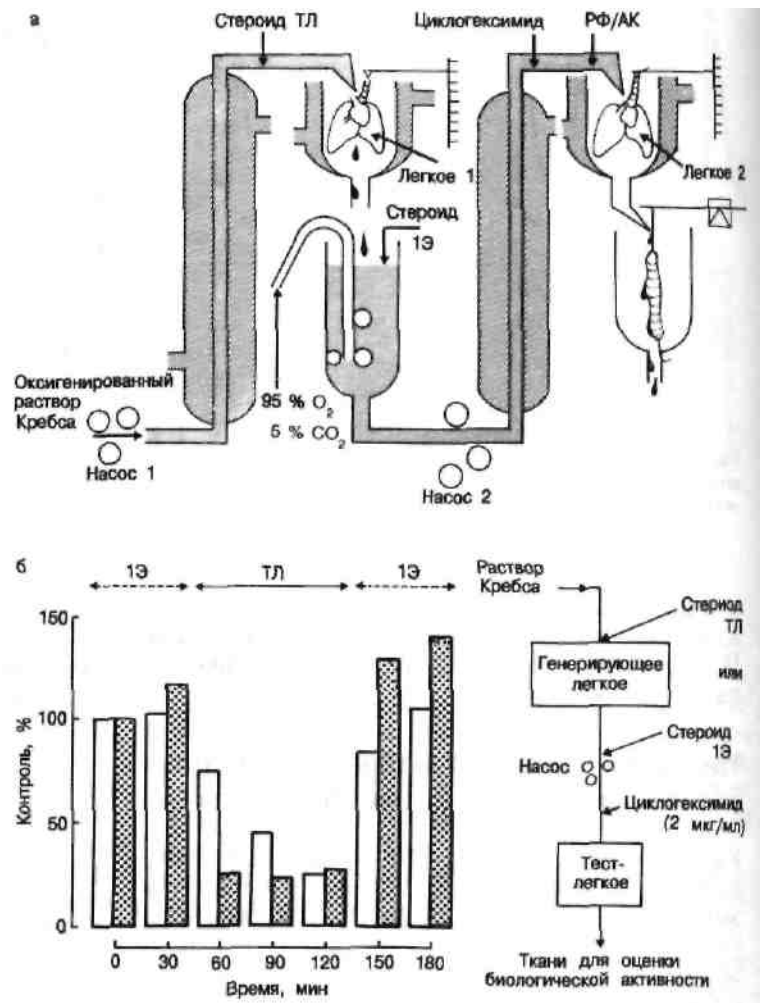


Рис. 109. Фактор, индуцированный стероидами, выделяется в эфлюент легкого и может оказывать антифосфолипазное действие на второе легкое.

Оба легких перфузируются в определенной последовательности (а). Реоксигенированный эфлюент из генерирующего легкого направляется насосом в тест-легкое, которое также обрабатывается циклогексимидом для предотвращения действия стероидов. Дексаметазон (1 мкг/мл) инфузироваи или прямо в эфлюент первого легкого (1Э), или сначала пропускали через генерирующее легкое (ТЛ). После достижения равновесия стероиды вводили в 1Э, при этом изменения активности фосфолипазы не происходило (б). Однако при инфузии ТЛ наблюдалось немедленное падение фосфолипазной активности второго легкого, что свидетельствует о возвращении уровня фактора, обладающего антифосфолипазной активностью к контрольным значениям. Светлые столбики-биооценка, темные-радиооценка.

Несмотря на целесообразность модели перфузируемых легких, она не является типичной для многих типов экспериментальных моделей. Аналогичный эффект наблюдается при использовании некоторых других типов клеток. Например, перитонеальные макрофаги крысы образуют простагландины при инкубации с бактериями. В присутствии глюко-кортикоидов это образование подавляется, но оно может быть восстановлено добавлением арахидоната. Последующие исследования показали, что эффект стероидов зависит от биосинтеза *de novo* белка и РНК; как и в легких, блокирующее действие стероидов связано с растворимым белком, выделяемым макрофагами. Определена связь между дозой гидрокортизона и количеством выделенного инги-

биторного пептида, причем нижняя часть кривой доза - ответ проходит в области, соответствующей нормальной концентрации стероидов надпочечников в крови.

Характеристики белковых факторов перфузируемых легких морских свинок и инкубируемых перитонеальных макрофагов крыс, по-видимому, весьма сходны, а при гель-хроматографии подтверждается их близость по молекулярной массе (например, 15 000). Вполне вероятно, что они идентичны или по крайней мере близкородственны. Белок крысиных лейкоцитов назван «макрокортином», и все экспериментальные данные свидетельствуют о его сходстве с легочным макрокортином.

Если перитонеальные макрофаги могут индуцироваться к выделению макрокортина in

in vitro, то не исключено, что подобные события происходят *in vivo* после введения стероидов. Для проверки этой гипотезы крысам вводили глюкокортикоиды (обычно дексаметазон), а затем спустя 1-5 ч собирали при помощи лаважа белки перитонеальной полости (перитонеальная полость содержит большое количество резидентных макрофагов). В лаважной жидкости определялось наличие антифосфолипазной активности, которая повышалась в несколько раз после введения дексаметазона или гидрокортизона. Интересно, что у адренэктомизированных крыс базальный уровень макрокортина был значительно ниже, но ответ на стероиды сохранялся на нормальном уровне. Это свидетельствует о существовании постоянного стероидного давления, которому подвергаются все здоровые млекопитающие и которое отвечает за фоновые значения макрокортина в лаважной жидкости. АКТГ также вызывает появление макрокортина в лаважной жидкости; то же наблюдается при стрессе (содержание крыс в холодной комнате в течение 30 мин). Ни один из стимулов не был эффективным у адреналэктомизированных крыс, что указывает на критическую роль надпочечников в этой реакции.

Липокортиновое семейство белков: макрокортин, ренокортин и липомодулин

Хотя в данной главе основное внимание уделяется открытию макрокортина, другие группы исследователей, занимавшиеся проблемой действия стероидов, достигли аналогичных результатов.

Идея о том, что глюкокортикоиды индуцируют синтез антифосфолипазного белка, была одновременно выдвинута Hirata и Axelrod (Национальный институт здоровья, США). В серии изящных экспериментов они показали, что ингибиторное влияние глюкокортикоидов на хемотаксис лейкоцитов связано с образованием гликопротеина с молекулярной массой примерно 70000 дальтон. Образование белка, названного липомодулином, зависит от оккупации рецептора, ДНК-зависимого синтеза РНК и синтеза белка. В больнице Necker (Париж) другая группа исследователей выделила белковую фракцию из культивируемых почечных клеток, обработанных глюкокортикоидами, которая подавляет фосфолипазу A_2 . Эта фракция представляет собой смесь белков с молекулярной массой 15 и 30 К.

Вскоре было установлено, что все эти белки иммунологически родственны и, вероятно, образуются при протеолитическом распаде белка 40 К. Позже это семейство белков было названо «липокортинами», а белок 40 К - просто «липокортином».

Очистка, определение аминокислотной последовательности и клонирование липокортина

Недавно был очищен белок 40 К и определена его аминокислотная последовательность; его человеческий ген был клонирован учеными из Biogen Genetic Engineering Company (США).

Белок, который является мономером, достаточно необычен ввиду высокого содержания в нем аминокислотных остатков с большим зарядом; поэтому данная молекула очень полярна. Белок достаточно консервативен: выявлено большое сходство липокортина у крысы и у человека.

Ген, кодирующий липокортин, очень чувствителен к стероидам, уровень иРНК для липокортина повышается после стимуляции клеток глюкокортикоидами.

Неожиданным является то, что при определении внутренней структуры белка липокортина обнаружены четыре повторяющиеся субъединицы, которые способны связывать кальций и фосфолипид. Это свойство служит характеристикой семейства белков, располагающихся в клеточных мембранах, которым давались различные наименования разными группами исследователей. Весьма вероятно, что липокортин идентичен или близкородствен некоторым из этих белков. Как показали недавние исследования, существует несколько типов липокортина, хотя неизвестна биологическая роль и других членов этого семейства. Repinsky и соавт. (1988) предположили существование связи между семейством липокортина и другими мембранными белками, связывающими кальций и липиды.

При изучении внутренней структуры липокортина получено возможное объяснение механизма его влияния на фосфолипидный гидролиз. Липокортин может сильно связываться с анионными фосфолипидами в присутствии кальция, поэтому предложена модель подавления липокортином фосфолипазы, согласно которой механизмом является конкуренция за субстрат. Davidson и соавт. (1987) подтвердили возможность этого механизма; однако необходимо помнить, что липокортин может само-

стоятельно связываться с фосфолипазой A_2 . Очевидно, что действительный механизм, с помощью которого белок предотвращает фос-фолипидный гидролиз, крайне сложен.

Противовоспалительное действие липокортина

Высокоочищенный белок обладает сильным противовоспалительным действием в моделях острого воспаления, таких как каррагенановый плеврит и каррагенановый отек лапы. Он активен при введении парентеральными способами (местно, внутривенно, подкожно или внутримышечно) в дозах, выражающихся в мкг/кг. При определении *in vitro* липокортин подавляет образование медиаторов изолированных клеток, предупреждая хемотаксис, ми-тогенез лимфоцитов и секрецию гистамина тучными клетками. При системном введении (в противоположность местному) основным действием липокортина является предупреждение направленной миграции лейкоцитов в зону воспаления, тогда как при местном введении происходит снижение концентрации воспалительных медиаторов, что препятствует полному развитию воспаления.

Группа исследователей из Национального института здоровья показала, что у большого числа больных с тяжелым воспалительным заболеванием в плазме содержатся аутоанти-тела к липотропину, что свидетельствует о нарушении системы контроля воспаления.

О возможности контроля активности липокортина фосфорилированием

Фундаментальным вкладом в понимание регуляции фосфолипазы A_2 является открытие Hirata регуляции фосфолипазной активности липотропина с помощью фосфорилирования. Длительное время было непонятно, каким образом контролируется мембранная фосфо-липаза, т. е. как она активируется или подавляется в зависимости от потребностей. Совершенно очевидно, что мембрана должна сильно повреждаться, если фосфолипаза постоянно находится в активном состоянии. Согласно схеме Hirata, мембранные фосфолипазы постоянно связаны с липотропином и поэтому неактивны. Когда клетки стимулируются агентами, активирующими фосфолипазу (например, хемотаксическим трипептидом ф.мет-лей-фен), липокортин фосфорилируется. Этот про-

цесс, возможно, опосредованный протеинкиназой С, связанной с рецептором, инактивирует липокортин, переводя фосфолипазу А₂ в каталитически активное состояние.

Изучение аминокислотной последовательности липокортина выявило наличие двух фосфорилируемых центров, один из которых представлен тирозином. Реактивация фосфорилированного белка происходит при удалении фосфатной группы реакцией, катализируемой гидролитическим ферментом щелочной фосфатазой.

Количество липокортина в клеточной мембране, которое постоянно уменьшается в результате протеолитического распада и нормальных процессов обмена, находится под контролем стероидов. При изучении адренал-эктомированных крыс, у которых не происходит восстановления липокортина, показано, что лейкоциты, лишенные стероидов, имеют более высокие фоновые значения активности фосфо-липазы А₂.

Липокортин как возможный предшественник нового поколения противовоспалительных препаратов

Хотя в настоящее время еще нет полной определенности, не исключено, что или сам липокортин, или препарат, действие которого основано на подавлении фосфолипазной активности, однажды станет полезным для лечения больных с воспалительным заболеванием. Такое лечение могло бы сочетать в себе все преимущества стероидной терапии, но без серьезных побочных эффектов, сопровождающих обычное лечение стероидами.

Эта идея активно развивается в основных фармацевтических центрах, однако необходимо какое-то время, прежде чем выяснится, оправдал ли такой препарат возлагаемые на него надежды.

Нестероидные противовоспалительные препараты

М. М. Дейл, Дж. К. Формен (M. M. Dale, J. C. Foreman)

Нестероидные противовоспалительные препараты (НСПВП) представляют собой разнородную группу соединений. В данной главе рассматриваются лишь те соединения, для которых характерно хотя бы одно свойство - способность подавлять биосинтез простагландинов. Другие нестероидные противовоспалительные препараты, такие как золото, пеницилламин и хлорохин, будут описаны в последующих главах (см. главы 31, 32 и 33). НСПВП, подавляющие биосинтез простагландинов, называют также жаропонижающими анальгетиками, поскольку некоторые из них (не все!) обладают обезболивающим, жаропонижающим и противовоспалительным эффектами.

Как и у многих других используемых в клинике препаратов, терапевтические возможности НСПВП были открыты (у человека) задолго до понимания механизма их действия. В 1763 г. Rev. Edward Stone сообщил в Королевском обществе об эффектах коры ивы при лихорадке; затем было показано, что активным началом ивовой коры является гликозид салицин. Синтетические салицилаты натрия и ацетилсалициловая кислота (аспирин) заменили в терапии вещества из природных источников, но только в 1972 г. было показано, что ацетилсалициловая кислота и другие НСПВП подавляют биосинтез простагландинов. Это открытие сделало доступным новую систему определения- простагландинсинтетазу, которая позволила выявить неизвестные химические структуры, на основе которых в свою очередь были разработаны новые сильные НСПВП.

В табл. 28 приведены различные химические группы, к которым принадлежат основные НСПВП, и, хотя этот список далеко не полный, в него вошли основные представители каждого химического класса НСПВП.

Фармакологические эффекты

Все НСПВП обладают тремя основными эффектами: 1) противовоспалительным; 2) анальгезирующим; 3) жаропонижающим.

Таблица 28. Химическая классификация нестероидных противовоспалительных препаратов

Производные салициловой кислоты
Ацетилсалициловая кислота
Салицилат натрия Дифлунисал
Производные пропионовой кислоты
Напроксен Ибупрофен Кетопрофен
Флурбипрофен Фенбруфен
Производные анилина
Парацетамол
Ацетокислоты
Индометацин
Фенклофенак
Сулиндак
Оксиамы
Пироксикам
Пирозолоны
Оксифенбутазон
Азапропазон
Фенилбутазон
Фенамовая кислота
Мефенамовая кислота
Меклофснамовая кислота

Однако для любого конкретного препарата активность в отношении каждого из этих эффектов может значительно различаться. Например, парацетамол является очень слабым противовоспалительным агентом, но достаточно сильным анальгезирующим и жаропонижающим средством, а у ацетилсалициловой кислоты противовоспалительная, обезболивающая и жаропонижающая активность выражена примерно одинаково. Причины этих различий будут обсуждаться ниже.

Биосинтез простагландинов

Открытие механизма действия НСПВП, которое было сделано Vane и его коллегами, началось с описания веществ, выделяемых легкими морских свинок при анафилаксии.

Этот материал с очень коротким периодом полураспада определялся по способности вызывать сокращение гладких мышц аорты кроликов, ввиду чего и был назван веществом, сокращающим аорту кроликов (ВСАК). Выделение ВСАК легкими блокируется ацетилсалициловой кислотой; арахидоновая кислота, напротив, вызывает его высвобождение. Впоследствии было показано, что ВСАК представляет собой тромбоксан A_2 . Эти наблюдения подготовили почву для гипотезы о подавлении ацетилсалициловой кислотой циклооксигеназии арахидоновой кислоты, что приводит к нарушению образования простагландинов, тромбоксанов и других продуктов циклооксигеназы. Это предположение было подтверждено исследованием эффектов ацетилсалициловой кислоты и других НСПВП в отношении активности простагландинсинтетазы (циклооксигеназы) в гомогенатах легких с использованием в качестве субстрата арахидоновой кислоты. В табл. 29 показана активность различных НСПВП как ингибиторов простагландинсинтетазы. Отличительной чертой результатов, представленных в таблице, является вариабельность IC_{50} , которая может объясняться по крайней мере двумя факторами. Во-первых, простагландинсинтетаза может

быть представлена не единичным белком, а семейством различных изоферментов, причем разные ткани могут экспрессировать разные изоферменты. Во-вторых, поскольку разные препараты подавляют фермент посредством различных механизмов, то условия проведения экспериментов могут влиять на активность препаратов. Этот аспект детально обсуждается ниже на примере парацетамола. Важность условий определения также можно показать на примере значения концентрации субстрата. Так, некоторые препараты при низких концентрациях субстрата в 20-500 раз активнее, чем при высоких.

Некоторые факторы, помимо неодинаковой чувствительности к НСПВП простагландинсинтетазы из разных источников, осложняют соотнесение активности этих препаратов *in vivo* как противовоспалительных, анальгезирующих или жаропонижающих с их же активностью *in vitro* в отношении фермента. К этим факторам относятся связывание с белком, проникновение препарата в клетки и ткани, метаболизм и рН ткани. С учетом этих факторов будут обсуждены три основных свойства данной группы препаратов в контексте их способности подавлять активность простагландинсинтетазы.

Противовоспалительное действие

На многих различных моделях НСПВП не снимают воспаления; они скорее ограничивают его или изменяют его временные характеристики. Наиболее вероятное объяснение этого — существование медиаторов, отличных от циклооксигеназных продуктов арахидоновой кислоты. При использовании каррагенана для индукции воспаления у крыс его начальные проявления опосредуются гистамином и серотонином. Между 1-м и 6-м часом после введения каррагенана главными медиаторами воспалительной реакции являются кинины. Простагландины определяются в воспалительном экссудате через 6 ч после введения каррагенана и достигают пика между 18-м и 24-м часом. НСПВП ослабляют более позднюю фазу каррагенанового воспаления и не влияют на начальную фазу. Таким образом, способность НСПВП модифицировать определенный этап реакции на каррагенан хорошо согласуется с ролью простагландинов в данной модели воспаления. В другой модели воспаления (действии ультрафиолетового облучения на кожу) наблюдается аналогичная связь между обра-

Таблица 29. Подавление активности простагландинсинтетазы из разрушенных клеток различного происхождения нестероидными противовоспалительными препаратами

Препарат	Источник простагландинсинтетазы	IC_{50} , мкМ
Ацетилсалициловая кислота	Легкие морских свинок	35
То же	Семенные пузырьки быка (СПБ)	9000
Индометацин	СПБ	0,07-40
Ибупрофен	СПБ	650
Фенилбутазон	СПБ	430
Меклофенамовая кислота	СПБ	7
Индометацин	Семенные пузырьки барана	0,5
Индометацин	Легкие морских свинок	0,6
Индометацин	Тромбоциты человека	1,3
Индометацин	Мозг кроляков	0,6-3,6
Индометацин	СПБ (АК 1 мМ)*	40
Индометацин	СПБ (АК 1 мМ)*	0,6
Ибупрофен	СПБ (АК 1 мМ)	650
Ибупрофен	СПБ (АК 1 мМ)	6
Ацетилсалициловая кислота	СПБ (АК 1 мМ)	9000
То же	СПБ (АК 1 мкМ)	1100

Различные концентрации субстрата (арахидоновая кислота-АК).

зованием простагландинов и временем выявления эффекта НСПВП. НСПВП отсрочивают реакцию, индуцированную ультрафиолетовым облучением, подавляя образование простагландинов, но не отменяют ее полностью, поскольку в ней участвуют и другие медиаторы.

При ревматоидном артрите применение ацетилсалициловой кислоты позволяет снизить (до неопределяемых значений) уровень простагландинов в синовиальной жидкости, однако воспалительный процесс лишь несколько ослабевает.

К эффектам простагландинов при воспалении относятся вазодилатация и повышение сосудистой проницаемости. Вызываемое простагландинами расширение сосудов достаточно длительно сохраняется в коже, но в других областях оно бывает кратковременным. Кроме того, простагландины обуславливают длительный антагонизм к сосудосуживающему действию норадреналина и других вазоконстрикторов. Простагландины менее эффективны в индукции повышенной сосудистой проницаемости по сравнению с индукцией вазодилатации. Сравнение ПГЕ₁ с гистамином в дозах, вызывающих эквивалентную вазодилатацию, показало, что гистамин дает больший отек, чем ПГЕ₁. В то же время простагландины усиливают образование отека другими медиаторами, которые вызывают повышение сосудистой проницаемости (гистамин). Показано, что отек, индуцированный гистамином или брадикинином, усиливается при их совместном введении с ПГЕ₁. Кроме того, ПГЕ₁ увеличивает отек, индуцированный инъекцией каррагенана в лапу крыс, которым вводили индометацин. Предварительное введение индометацина необходимо для предупреждения простагландинового синтеза, вызываемого каррагенаном, поэтому в данном эксперименте показано, что ПГЕ₁ усиливает воспалительный отек, индуцированный другими медиаторами, выделяющимися в ответ на каррагенан. Этот важный результат позволяет объяснить, почему НСПВП подавляют воспалительный отек несмотря на слабое влияние самих простагландинов на сосудистую проницаемость. Вызванное простагландинами усиление отека происходит, вероятно, за счет увеличения кровотока в микроциркуляции, сосуды которой становятся более проницаемыми под действием других медиаторов (гистамина или брадикинина). Таким образом, сосудистые эффекты индуцируются другими медиаторами, а простаглан-

Таблица 30. Сравнительная активность НСПВП как ингибиторов простагландинсинтетазы и противовоспалительных агентов

Препарат	Относительная противовоспалительная активность ¹	Относительная активность в подавлении синтеза ПГ ²
Индометацин	1	1,0
Ацетилсалициловая кислота	0,007	0,002
Фенилбутазон	0,12	0,011
Диклофенак	3,0	3,5
Ибупрофен	0,035	0,14
Напроксен	0,3	1,0
Оксифенбутазон	0,026	0,003
Флуменамовая кислота	0,19	0,5
Меклофенамовая кислота	0,4	2,8
Мефенамовая кислота	0,07	18,71

¹ Активность в подавлении вызванного каррагенаном отека лапки крыс по сравнению с активностью индометацина.

² Подавление образования ПГ циклооксигеназой разрушенных клеток по сравнению с действием индометацина. Активность препаратов в отношении их влияния на синтез простагландинов определена по результатам нескольких опубликованных исследований, в основном представленных в табл. 29; поэтому приведенные в таблице значения могут быть использованы лишь для приблизительной оценки, и их нельзя интерпретировать количественно.

дины опосредуют усиление отека (см. главу 17).

Представлены убедительные доказательства, касающиеся механизма подавления НСПВП вазодилатации и отека при воспалительных реакциях, в которых простагландины играют роль медиаторов. Действительно, все препараты, у которых обнаружена способность к ингибированию простагландинсинтетазы, могут подавлять или ослаблять воспаление. Однако существует проблема связи между активностью препарата и его способностью к подавлению простагландинсинтетазы и воспаления; в табл. 30 иллюстрируется это положение. Однако, как уже отмечалось, сравнение активности в бесклеточной ферментативной системе и активности *in vivo* не может быть валидным по ряду причин. Поясним это подробнее на примере салицилатов. По сравнению с ацетилсалициловой кислотой салицилат является слабым ингибитором синтеза простагландинов *in vitro*; однако оба препарата одинаково эффективны при подавлении индуцированного каррагенаном отека лап у крыс. Оба препарата обладают сходной активностью, уменьшая образование простагландинов *in vivo* у человека и крыс. Одним из возможных

объяснений здесь является то, что гентизиновая кислота, метаболит салицилата, в 30 раз сильнее самого салицилата в отношении подавления активности простагландинсинтетазы. Таким образом, низкая активность салицилата в отношении синтеза простагландинов *in vitro* может быть связана с отсутствием *in vitro* метаболизма салицилата до более активного соединения.

Другое объяснение различий между противовоспалительной активностью НСПВП и их способностью угнетать циклооксигеназу получено в экспериментах по изучению действия парацетамола на циклооксигеназу из различных источников. Парацетамол в 10 раз менее активен, чем ацетилсалициловая кислота, в отношении фермента из селезенки собак, но проявляет почти одинаковую с ней активность в отношении фермента из головного мозга кроликов. Таким образом, очень слабый противовоспалительный эффект парацетамола может отражать нечувствительность изофермента циклооксигеназы в одной ткани по сравнению с другой. Концепция изоферментов для объяснения различных форм активности НСПВП должна восприниматься с некоторой осторожностью, поскольку разные образцы ферментов, приготовленных из различных тканей, в основном не контролируются при одинаковых условиях рН, ионной силы и кофакторов. При соблюдении этих условий в одном из исследований (что также может быть неадекватным, поскольку не все клетки обладают одинаковым состоянием цитозоля) не было обнаружено различия в активности различных НСПВП в отношении разных ферментативных образцов. В данном исследовании был сделан вывод об отсутствии изоферментов циклооксигеназы.

Анальгетическое действие

Анальгетическое действие НСПВП проявляется как на периферии, так и в центральной нервной системе, но доминируют периферические эффекты. Более того, представлены доказательства того, что периферическое анальгетическое действие препаратов связано с их противовоспалительным эффектом. При нанесении простагландинов на основании волдыря на коже человека их эффективность как анальгетических агентов невысока, поскольку они не сами вызывают боль, а индуцируют состояние гипералгезии, повышая чувствительность периферических болевых рецепторов к механи-

ческим и химическим стимулам, например к брадикинину и гистамину. Гипералгезия, индуцируемая простагландинами, сохраняется длительное время и не блокируется НСПВП. Таким образом, НСПВП не изменяют реакции периферических ноцицепторов на простагландин, а предотвращают образование простагландинов, которое вызвано повреждающими стимулами, и тем самым предупреждают развитие простагландиновой гипералгезии.

При прямой регистрации активности нейронов центральной нервной системы показано, что ацетилсалициловая кислота уменьшает разряды, вызванные повреждающими периферическими стимулами. Например, у крыс с хроническим адьювантным артритом увеличение разрядов регистрируется в нейронах вентробазального таламуса при движении пораженного сустава. Ацетилсалициловая кислота уменьшает разряды ноцицептивных нейронов дорсального рога в ответ на предъявление термических стимулов на периферическое рецепторное поле. Электроэнцефалографическая регистрация у людей выявляет уменьшение под действием препарата кортикальных вызванных потенциалов при стимуляции зубов. Во всех этих экспериментах препарат вводили перорально или парентерально, поэтому влияние на нейрональную функцию могло осуществляться за счет угнетения синтеза простагландинов, который индуцировался периферическими или центральными стимулами. Альтернативно ацетилсалициловая кислота или другие НСПВП могут проявлять анальгетическое действие, не связанное с угнетением простагландинсинтетазы. У кошек электрическая стимуляция пульпы зуба вызывает болевые стимулы, чувствительные к анальгетическому действию НСПВП, но при этом образование простагландинов играет незначительную роль (или вовсе не имеет значения).

Таким образом, в настоящее время возможно объяснение анальгетического действия НСПВП с учетом подавления синтеза простагландинов на периферии и в центральной нервной системе; однако препараты могут обладать и другими анальгетическими эффектами, не связанными с подавлением биосинтеза простагландинов.

Жаропонижающее действие

Механизмы пирогенеза и роль простагландинов в возникновении лихорадки обсуждались в главе 19. Скажем только, что представлены

веские доказательства участия простагландина E, образуемого в гипоталамусе в ответ на интерлейкин-1, в настройке механизмов регуляции температуры в гипоталамусе. Это образование простагландинов подавляется НСПВП, чем, вероятно, и объясняется антипиретическое действие препаратов. Однако существует ряд данных, не вписывающихся в эту модель, поэтому вполне вероятно, что НСПВП могут подавлять действие простагландинов на гипоталамус. Кроме того, существуют альтернативные механизмы индукции лихорадки, которые нечувствительны к подавлению НСПВП.

Механизм действия на циклооксигеназу жирных кислот

Как показано выше, первичное действие НСПВП заключается в подавлении образования из арахидоновой кислоты циклической эндоперекиси PG_2 . В большинстве случаев процесс подавления включает в себя связывание препарата с ферментом, причем есть данные о наличии двух мест связывания. Активность препаратов соотносится со взаимодействием с активным центром фермента, однако важное значение имеет и контакт с дополнительным местом связывания. Вероятно, слабые ингибиторы циклооксигеназы взаимодействуют главным образом с дополнительным центром.

Подавление циклооксигеназы может происходить несколькими путями, описанными Lands (1981).

1. Необратимая, зависящая от времени инактивация фермента. Наиболее ярким примером препарата с таким действием на циклооксигеназу является ацетилсалициловая кислота. Она образует ковалентную связь с остатком серина фермента. Для продолжения синтеза простаноидов и тромбоксанов необходим синтез нового фермента. В результате этого эффект препарата продолжается какое-то время после выведения его из ткани. Некоторые другие НСПВП, такие как индометацин, также обладают зависимым от времени характером инактивации циклооксигеназы. Однако имеют данные, что действие индометацина является легкообратимым.

2. Быстрое, обратимое, конкурентное подавление. Некоторые НСПВП, например ибупрофен, обратимо связываются с ферментом (K_D -5 мкМ), конкурируя с природным субстратом

арахидоновой кислотой (K_D -2 мкМ). В реакции участвуют гидрофобные силы. Таким же действием обладает пироксикам.

3. Быстрое, обратимое, неконкурентное подавление, в котором участвует антиоксидантный эффект, или эффект ловушки свободных радикалов. Основой этого эффекта является то, что циклооксигеназная активность включает необычную положительную обратную связь, заключающуюся в образовании липидных пероксидов, которые ускоряют действие фермента. Длительное присутствие липидных перекисей необходимо для поддержания циклооксигеназной активности; их высокие концентрации, напротив, угнетают фермент. В нормальных условиях клеточные пероксидазы поддерживают низкий уровень перекисей, но циклооксигеназа может стимулироваться перекисями липидов в концентрации примерно 10 нМ, что на несколько порядков ниже K_T для большинства пероксидаз, таких как глутатионпероксидаза и пероксидаза, превращающие PG_2 в PH_2 . Таким образом, небольшие количества гидроперекисей, ускользающие от действия пероксидаз, могут стимулировать образование простаноидов.

Поступление нейтрофилов и моноцитов в места воспаления характеризуется заметным увеличением синтеза простаноидов. Недавно показано, что эти клетки образуют «активатор» циклооксигеназы, который, вероятно, представляет собой смесь H_2O_2 и липидных перекисей.

Некоторые НСПВП, такие как парацетамол, оказывают действие, участвуя в связывании субстрата с ферментом, а также (частично) за счет антагонизма в процессе активации циклооксигеназы H_2O_2 и перекисями липидов. При высоких уровнях этих соединений, например при активации фагоцитирующих клеток в очаге острого воспаления, парацетамол неэффективен в подавлении синтеза простаноидов и, следовательно, имеет низкую активность как противовоспалительный препарат. Однако он эффективен при состояниях с невысоким уровнем лейкоцитарной инфильтрации.

Отдаленное влияние на воспалительный процесс подавления циклооксигеназы НСПВП

Препараты, угнетающие циклооксигеназу и тем самым уменьшающие образование простаноидов и тромбоксанов, обладают весь-

ма важными прямыми противовоспалительными эффектами, которые были описаны выше.

Однако уменьшение синтеза простаноидов может обусловить и ряд противовоспалительных эффектов. Показано, что простагландины E_2 и I_2 оказывают сильное стимулирующее действие на аденилатциклазу, активируя тем самым цАМФ-зависимую киназу. В воспалительных клетках, таких как полиморфно-ядерные клетки и мононуклеарные лейкоциты, этот фермент играет преимущественно ингибиторную роль, снижая их активацию. ПГЕ, образуемые макрофагами, тормозят некоторые функции лимфоцитов: пролиферацию и выделение лимфокинов (см. главу 14). Согласно последним данным, этот эффект частично связан с прямым действием на клетки в митозе и частично-с активацией супрессорных Т-клеток (хотя некоторые исследователи утверждают наличие угнетающего действия ПГЕ₂ на супрессорные Т-клетки). Простагландины E также снижают выделение лизосомных ферментов нейтрофилов и гистамина тучных клеток, уменьшают образование продуктов O_2 , повреждающих ткани, в макрофагах и нейтрофилах.

Таким образом, продукты циклооксигеназы могут угнетать функции лейкоцитов и уменьшать повреждение тканей, а препараты, подавляющие образование этих продуктов, могут в некоторых условиях (особенно при хроническом воспалении) вызывать противовоспалительный эффект.

Другим способом, посредством которого ингибиторы циклооксигеназы могут нарушать регуляцию иммунных и воспалительных реакций, является увеличение образования других эйкозаноидов. Снижение метаболизма арахидоната циклооксигеназой приводит к увеличению количества субстрата для других ферментов, действующих на эту жирную кислоту.

Показано *in vivo* и *in vitro*, что в присутствии ингибиторов циклооксигеназы образуется большее количество продуктов 5-липоксигеназного пути. Так, в частности, увеличивается образование ЛТВ₄, который обладает выраженными хемотаксическими свойствами и иммунорегуляторными эффектами. Значение *in vivo* первой формы активности пока не ясно, поскольку НСПВП в разных экспериментах как увеличивают, так и уменьшают накопление клеток.

Эффекты НСПВП, не опосредованные циклооксигеназой

Хотя главной мишенью НСПВП является циклооксигеназа, в исследованиях *in vivo* могут быть выявлены и другие эффекты, лежащие в основе различий между разными препаратами.

Некоторые из них, такие как индометацин и фенаматы, оказывают ингибиторное действие и на другие ферменты, а именно: на фосфо-липазу A_2 , диацилглицеролкиназу и диацилглицероллипазу. В случае индометацина эти эффекты (хотя они и требуют значительно более высоких концентраций, чем при подавлении циклооксигеназы) достижимы *in vivo* при проведении лечения (примерно 1 мкг/мл). Действие на ферменты, метаболизирующие диацилглицерол, может привести к повышению его концентрации. А поскольку диацилглицерол является эндогенным активатором протеинкиназы C, этот факт может объяснить увеличение образования токсических метаболитов кислорода в нейтрофилах человека и в макрофагах морских свинок, а также фактора некроза опухолей и интерлейкина-1 человеческими моноцитами под действием индометацина. Другим возможным объяснением является то, что препараты, нарушая арахидоновый метаболизм, увеличивают образование липоксина A, который также активирует протеинкиназу C. Любой из этих форм активности можно объяснить усиление повреждений суставов под действием индометацина при артрите, индуцированном антигеном у морских свинок.

Некоторые неспецифические эффекты ряда НСПВП в отношении ферментов могут быть связаны с высокой гидрофобностью их молекул. Это свойство имеет важное значение для связывания с белками и взаимодействия с мембранами. Выявлена четкая корреляция между эффективностью НСПВП и их связыванием с сывороточным альбумином, который обладает липофильными «карманами». Наличием аналогичной липофильно-пептидной последовательности у различных ферментов может легко объясняться их чувствительность к подавлению такими препаратами, как индометацин.

Гидрофобная природа многих НСПВП, по-видимому, лежит в основе вмешательства этих препаратов в связывание фагоцитов с гидрофобными медиаторами (ф. мет-лей-фен), а также в последующую стимуляцию клеток этими пептидами, что показано во многих

исследованиях. С другой стороны, большинство НСПВП не подавляет взаимодействия медиатора ФАТ с его рецептором. Показано, что многие НСПВП угнетают клеточное накопление (особенно мононуклеарных клеток) при некоторых типах воспаления у экспериментальных животных. По поводу этой активности высказываются и другие точки зрения, поскольку профили активности различных НСПВП отличаются от таковых при влиянии на миграцию мононуклеарных клеток.

Возможно, что НСПВП оказывают и другое влияние на воспаление, необязательно связанное с подавлением циклооксигеназы (или с последствиями ее подавления) и обуславливающее провоспалительные эффекты, особенно при хроническом воспалении.

Совершенно ясно, что НСПВП являются полезными и эффективными при снятии симптомов воспалительных состояний. Вопрос заключается в следующем: не усугубляют ли они основные состояния в случае их длительного применения при хронических воспалительных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит. Более точное понимание эффективности НСПВП как противовоспалительных препаратов при хроническом воспалении требует, чтобы в экспериментальных исследованиях отражалось значительно большее знание ситуации, превалирующей *in vivo* при таких состояниях. Так, исследования влияния этих препаратов на хемотаксис лейкоцитов не должны проводиться с использованием ф.мет-пептидов в качестве хемотаксических агентов. При исследовании влияния препаратов данной группы на выделение ферментов или образование токсических продуктов кислорода фагоцитирующими клетками не должны использоваться растворимые хемотаксины совместно с цитохалазином В; следует включать лиганды, имеющие большее отношение к ситуации *in vivo*, например лиганды, взаимодействующие с рецепторами к Fc и C3b, такие как комплекс антиген-антитело. Более того, при использовании *in vitro* концентрации НСПВП должны соответствовать концентрациям, достигаемым *in vivo*, т.е. примерно 1 мкМ или меньше. Возникает еще один не менее сложный вопрос: оказывают ли препараты влияние на регуляцию иммунитета *in vivo* и как это отражается на прогнозе. Ответ на него может быть получен лишь при тщательно контролируемом проспективном клиническом исследовании.

Поскольку другие свойства НСПВП, кроме подавления активности циклооксигеназы, так-

же могут иметь важное значение, скрининг новых НСПВП только по определению синтеза простагландинов не может быть адекватным. Применение этого метода чревато неадекватным использованием микросомальных образцов, поскольку величины IC₅₀, полученные для конкретного препарата, например для индометацина, варьируют в разных лабораториях от 0,07 до 20 нм. Более надежным методом представляется определение выделения простагландинов макрофагами. При его применении эффективность индометацина варьирует от 1 до 10 нм в трех лабораториях, хотя в них использовались разные источники клеток (мышинные, человеческие и клетки морских свинок), различные культуральные условия и разные стимулы.

Токсические побочные эффекты

Поскольку НСПВП представляют собой ряд разнородных химических соединений, ясно, что большинство из них обладает токсическими эффектами, уникальными для конкретной химической структуры. Целью данного раздела главы является не перечисление имеющихся токсических эффектов НСПВП, а рассмотрение нежелательных реакций и токсических эффектов, свойственных всем НСПВП. Ввиду того что общим свойством НСПВП является подавление простагландинсинтетазы, токсические эффекты препаратов обсуждаются с учетом ее подавления.

Прежде всего надо отметить следующие токсические и неблагоприятные эффекты: 1) изъязвление и кровотечения в желудочно-кишечном тракте; 2) повреждения и некрозы почек; 3) задержка родов.

Другие возможные побочные эффекты терапии НСПВП упоминались выше в связи с провоспалительным действием этих препаратов. Возможно, и антипиретическое действие не всегда относится к лечебным эффектам (см. главу 19); однако этот вопрос еще не решен окончательно.

Изъязвление желудочно-кишечного тракта

Являясь слабыми кислотами, ацетилсалициловая кислота и некоторые другие НСПВП не ионизированы в кислой среде желудка, поэтому они быстро попадают в клетки его слизистой оболочки. Попав в клетку с более высоким значением рН цитозоля, препараты дис-

социируют и задерживаются в ней. В результате этого в клетке создается более высокая концентрация препаратов. Предполагается, что высокая внутриклеточная концентрация препаратов служит причиной подавления активности множества ферментов, включая цитохромоксидазы, что приводит к повреждению и в конечном счете к изъязвлению слизистой оболочки желудка. Возможно, повышение концентрации играет важную роль в вызываемых некоторыми НСПВП повреждениях желудка, однако это не может полностью объяснить появление повреждений, индуцируемых другими препаратами, у которых не отмечается внутриклеточной задержки или при системном введении которых наблюдаются подобные повреждения.

Подавление НСПВП образования цитопро-тективных простаноидов, вероятно, играет роль в возникновении поражений желудка при действии этих препаратов. ПГЕ₂ и ПП₂ увеличивают кровоток в слизистой оболочке желудка. ПГЕ₂ также подавляет секрецию кислоты париетальными клетками слизистой оболочки. Более того, показано, что ПГЕ₂ и некоторые его аналоги способствуют заживлению дуоденальных пептических язв, как и Н₂-антагонисты. Таким образом, предполагается, что НСПВП вызывают изъязвление желудочно-кишечного тракта в результате подавления в нем простаноидов, что приводит к снижению кровотока и ишемии и увеличивает продукцию кислоты, которая повреждает слизистую оболочку.

Известно, что под действием НСПВП происходят химические изменения в защитном барьере слизи, покрывающей слизистую оболочку желудка, что приводит к его повреждению. Этот эффект опять-таки может быть связан с подавлением синтеза простаноидов под влиянием НСПВП. При повреждении слизистого барьера возникает обратная диффузия кислоты из просвета желудка в клетки слизистой оболочки. Если же при этом снижается кровоток, то кислота не удаляется циркуляцией и повреждает клетки слизистой оболочки. Кроме того, обратная диффузия кислоты к основным клеткам активирует пепсиноген, который они продуцируют, что приводит к образованию активного пепсина, разъедающего слизистую оболочку.

Помимо индукции кислотных и ишемических повреждений, НСПВП подавляют агрегацию тромбоцитов (см. главу 4), что приводит к увеличению времени кровотечения из сосу-

дов, поврежденных изъязвлением. Таким образом, повышается вероятность кровотечения в зоне изъязвления.

Повреждения почек

Несколько лет назад НСПВП фенацетин был изъят из применения, поскольку его хроническое использование сопровождается почечным папиллярным некрозом. Сам по себе фенацетин не оказывает действия на простагландинсинтетазу почек, но его метаболит парацетамол обладает такой активностью.

Известно, что многие другие НСПВП вызывают повреждения почек при хроническом введении экспериментальным животным; однако у людей, длительное время получающих высокие дозы НСПВП при ревматоидном артрите, нефропатии наблюдаются относительно редко. Предполагают, что НСПВП проявляют различную нефротоксичность в зависимости от их химической структуры. Возможно, что в нефропатии, индуцированной НСПВП, может играть роль подавление синтеза простаноидов. Показано участие простагландинов в ауторегуляции и поддержании кровотока в почках; в частности, они осуществляют контроль кровотока между корой и мозговым веществом. НСПВП снижают кровоток внутренней коры, поэтому предполагают, что угнетение синтеза простаноидов участвует в папиллярном некрозе.

Задержка родов

Хотя это действие препаратов отнесено к нежелательным побочным эффектам, оно используется для терапевтической задержки преждевременных родов. В родах возрастают активность фосфолипазы А₂ и уровни простагландинов в амнионе. Простагландины Е₂ и F_{2α} ввиду их способности вызывать сокращение гладких мышц матки используются для индукции аборт. Показано, что для женщин, принимающих ацетилсалициловую кислоту, характерны более длительный период беременности, продолжительные роды и повышенная кровопотеря во время родов. Все эти эффекты могут быть связаны с подавлением биосинтеза простагландинов.

Заключение

НСПВП-это разнородная группа химических соединений, имеющих общее свойство - угне-

тение циклооксигеназы. Однако понимание механизмов подобного подавления в настоящее время довольно ограничено, и, хотя данный эффект препаратов может быть использован для объяснения многих фармакологических, терапевтических и токсических эффектов, какой-либо конкретный препарат может обладать и другим действием, которое вносит свой вклад как в лечебные, так и в нежелательные эффекты. Несмотря на все это, данные препараты относятся к наиболее важным противовоспалительным лекарственным средствам.

Дж. Ф. Борель (J. F. Borel)

Введение

Циклоспорин (ЦС-А) является циклическим ундекапептидом, выделенным из *Tolurocladi-um inflatum* Gams. Это соединение состоит из нескольких N-метилированных аминокислот и одной новой C₉-аминокислоты; его структура представлена на рис. ПО. Пептид нейтрален, богат гидрофобными аминокислотами, нерастворим в воде и n-гексане, но растворяется во многих других органических растворителях и в липидах.

История открытия ЦС-А началась в 1970 г., когда в морских образцах был найден новый штамм грибов (*Tolurocladium inflatum* Gams). Поиск потенциально активных веществ в морских организмах не является необычным направлением в разработке препаратов из природных продуктов. Многолетний опыт работы микробиологов и химиков, занимающихся выделением микробных метаболитов, показал, что такие соединения часто обладают цитостатической и другой фармакологической активностью в значительно большей степени, нежели антибактериальными свойствами, в связи с поиском которых они первоначально отбирались. ЦС-А испытывался в тест-системах, уже доказавших свою ценность при изучении подобных соединений.

В январе 1972 г. на мышинных моделях было обнаружено иммунодепрессивное действие метаболита, в том числе подавление гемагглютинации; однако соединение не оказывало какого-либо влияния на мышинные опухолевые клетки (P-815) в клеточных культурах и не повышало выживаемости лейкозных мышей. Такая иммуносупрессия оказалась новой, поскольку она не была связана с общей цитостатической активностью.

Для понимания необычной природы ЦС-А необходимо вспомнить этапы развития клинической иммунодепрессии. Приблизительно можно выделить три таких этапа. Первое поколение препаратов, используемых в клинике (циклофосфамид, азатиоприн, метотрексат и др.), обладает неспецифической цитотоксичностью в отношении всех делящихся клеток,

включая иммунокомпетентные. Следующим этапом стала разработка лимфоцитотоксических препаратов или процедур (например, антилимфоцитарная сыворотка, L-аспарагиназа, стероиды, общее лимфоидное облучение и т.д.), в результате применения которых происходит элиминация иммунокомпетентных клеток. Последний этап характеризуется избирательной иммунорегуляцией и использованием соединений или методов, специфически модулирующих определенные субпопуляции иммунокомпетентных клеток. ЦС-А представляется первым таким препаратом, до некоторой степени отвечающим этим требованиям и применяется в настоящее время в клинике. Поскольку ЦС-А является первым соединением, специфически и обратимо подавляющим иммунокомпетентные лимфоциты, его можно считать прототипом иммунодепрессивных препаратов нового поколения. Очевидно, ЦС-А даст новый импульс развитию иммунологии.

Фармакокинетика

Данные об абсорбции и элиминации ЦС-А были получены в условиях стационара после перорального и внутривенного введения препарата. У всех исследованных видов животных и у человека препарат выводится главным образом через печень и с желчью и лишь некоторое его количество - через почки. За 96 ч у человека с мочой выводится 6% пероральной дозы меченого ЦС-А. В неизменном виде с мочой выделяется только 0,1% введенного препарата (табл.31).

Метаболизм ЦС-А осуществляется в печени. Все метаболиты, еще не идентифицированные полностью, сохраняют интактную циклическую олигопептидную структуру исходного соединения. Наблюдаемые модификации заключаются в моно- и дигидроксилировании и N-деметиловании в разных частях молекулы. Основной путь биотрансформации ЦС-А представляется одинаковым у всех исследованных видов (крыса, кролик, собака, человек).

В табл. 32 показано распределение ³H-ЦС-А в плазме, лимфоцитах, гранулоцитах и эритро-

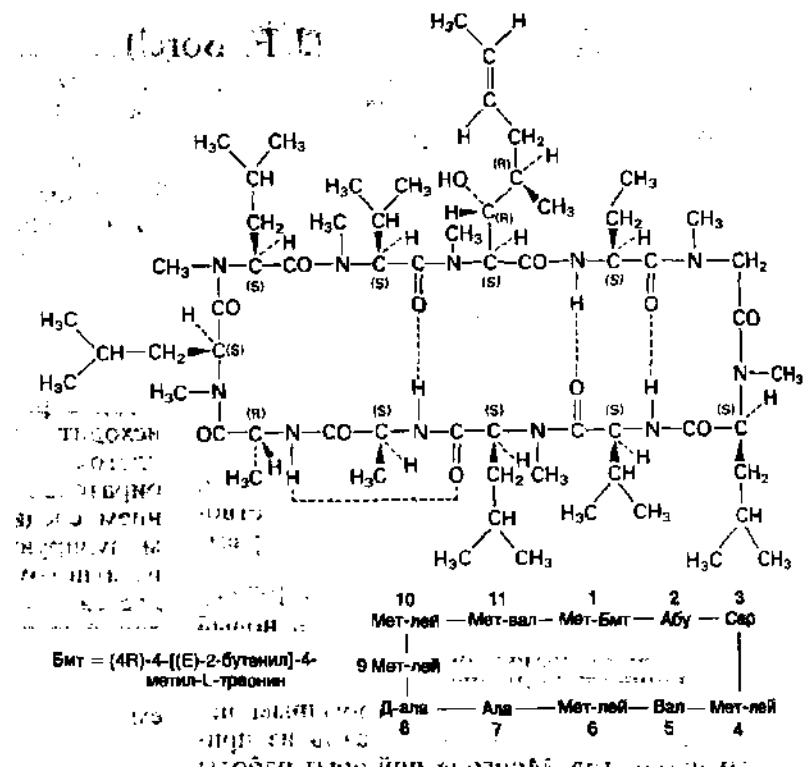


Рис. ПО. Химическая структура циклоспорина.

цитах через 20 мин после его добавления к человеческой крови. Примерно 34% препарата содержится в плазме: 5% - в свободном виде, 24% связано с липопротеинами и 5% связано с другими белками плазмы.

В настоящее время уровень ЦС-А в крови может определяться различными методами, включая биологический, радиоиммунологический и высокоразрешающую жидкостную хроматографию.

Таблица 31. Объединенные данные по фармакокинетике циклоспорина у человека

Абсорбция Абсолютная пероральная биодоступность	20-50% (в среднем 34%)
Время пика концентрации в плазме	1-6 ч
Распределение Связывание с белками плазмы Кажущийся объем распределения	90% (20 °C) 3,5 л/кг
Метаболизм Степень метаболизма Количество компонентов	Около 99% 17 (9 из них характеризуются как метаболиты)
Элиминация Время полувыведения Полный клиренс	Около 2 ч (а-фаза) Около 24 ч (Р-фаза) 0,66 л/мин

Таблица 32. Распределение циклоспорина (по компонентам крови) в зависимости от его концентрации

Концентра- нт/мл	Распределение, %			
	плазма	лимфо- циты	грануло- циты	эритро- циты
500	33	47	56	58
100	35	9	12	53
25	33			45

Иммunosuppressивные эффекты in vivo

Гуморальный иммунный ответ

ЦС-А сильно подавляет гуморальную иммунную реакцию, которая заключается в синтезе антител в ответ на антигены. Так, подавляется

образование В-лимфоцитами антител к Т-зависимым антигенам, например эритроцитам барана или гемоцианину моллюсков. Однако образование антител к Т-независимым антигенам, таким как липополисахариды, нарушается лишь в небольшой степени. С помощью метода оценки бляшкообразующих клеток у мышей, иммунизированных эритроцитами барана, можно выявить подавление как IgM-, так и IgG-бляшек. Более того, подавляется как первичный, так и вторичный ответ. Однако вторичный ответ угнетается в большей степени, чем первичный, для подавления которого необходимы более высокие дозы препарата; причем время его введения становится более критическим. При прекращении введения препарата иммунодепрессивный эффект быстро исчезает (рис. 111).

ЦС-А наиболее эффективен при его введении во время иммунизации (рис. 112), что указывает на раннее вмешательство препарата в антигенный запуск лимфоцитов; при этом его действие можно легко отличить от действия антимиотических (азатиоприн) или алкилирующих препаратов (циклофосфамид) (см. главу 27).

Клеточно-опосредованный иммунный ответ

ЦС-А сильно угнетает клеточный иммунитет, который играет главную роль в отторжении аллотрансплантата и гиперсенситивности замедленного типа. Так называемые сенсibilизированные лимфоциты образуются в ответ на различные антигенные стимулы.

ЦС-А эффективен в предупреждении оттор-

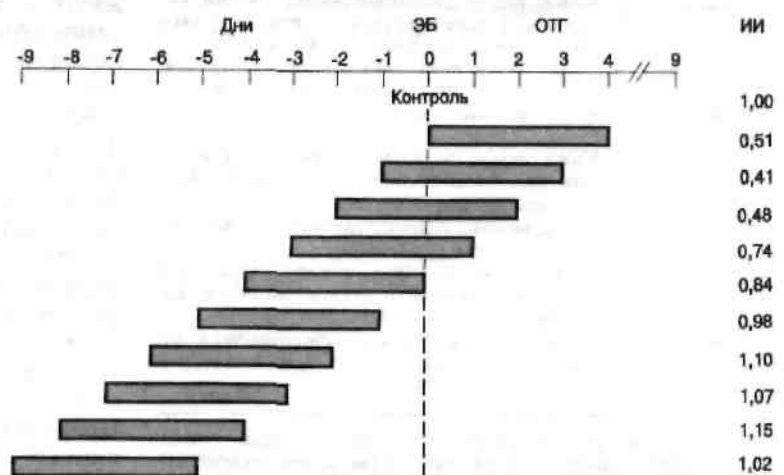
жения трансплантата. Препарат был исследован с хорошими результатами на огромном количестве экспериментальных моделей аллотрансплантатов, а также при трансплантации у человека (табл. 33).

Благодаря его избирательным фармакологическим эффектам, включая подавление различных функций фагоцитов, были успешно выполнены некоторые типы трансплантаций, ранее считавшиеся нереализуемыми. К ним относится трансплантация легких у собак в связи с нормальным заживлением анастомозов трахеи, а также трансплантация тонкого кишечника у свиней и собак, которые часто дополнительно осложнялись местными реакциями «трансплантат против хозяина» (ТПХ). Сообщалось и о пересадке аллогенной роговицы у кроликов, при этом отмечено, что для увеличения выживаемости трансплантата вполне достаточно одной местной аппликации препарата. Осуществлялась пересадка (с последующим нормальным функционированием) таких необычных трансплантатов, как скелетные мышцы и нервные клетки. Не меньший интерес представляет пересадка конкордантных ксенотрансплантатов, таких как почки и сердце.

Особый случай трансплантации представляет собой пересадка костного мозга для восстановления гемопоэтических органов. Без иммунодепрессивной терапии даже хорошо подобранные трансплантаты у людей, как правило, вызывают реакцию ТПХ, которую, однако, можно предотвратить или подавить с помощью ЦС-А. Аплазия костного мозга у крыс может быть вызвана бусульфаном, цик-

Рис. 111. Продолжительность иммуносупрессивного влияния ЦС-А на образование гемагглютининов у мышей.

Группам мышей вводили ЦС-А в течение 5 дней подряд. Осуществлялась предварительная иммунизация (0 на шкале «Дни»); титры в сыворотке каждой мыши определялись на 9-й день (ОТГ-определение титра гемагглютининов). ИИ - иммуносупрессивный индекс, выражающий отношение среднего значения титра ($-\log_2$) в группах мышей, получивших препарат, к контролю.



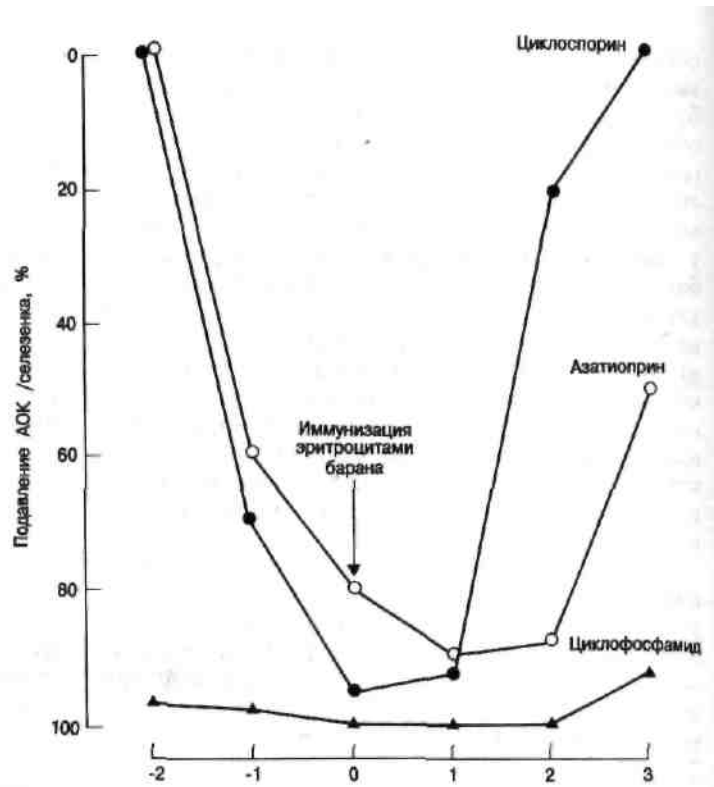


Рис. 112. Зависимость иммунодепрессивного действия от времени введения препарата с учетом иммунизации.

Мышам однократно перорально давали циклоспорин или внутрибрюшинно вводили эквивалентную дозу азатиоприна или циклофосфамида (от — 2-го до + 3-го дня). Иммунизация производилась в «нулевой» день, а прямое определение бляшкообразующих клеток — на 4-й день.

Таблица 33. Объединенные данные об успешно проведенных аллогенных и ксеногенных трансплантациях органов с использованием циклоспорина

Вид	Органы
Мыши	Кожа, костный мозг, мышечные клетки
Крысы ¹	Кожа, <i>сердце</i> , костный мозг, тонкий кишечник, поджелудочная железа, островки Лангерганса, нервные клетки, конечности
Кролики ¹	Кожа, <i>почки</i> , костный мозг, роговица, яичники и маточные трубы, конечности
Кошки	Кожа, костный мозг
Козы	<i>Сердце</i>
Собаки ¹	Кожа, <i>почки</i> , поджелудочная железа, костный мозг, кишечник, легкое, участки вен, опухоли
Свиньи	Кожа, печень, поджелудочная железа, тонкий кишечник
Обезьяны	Кожа, почки, поджелудочная железа, сердце, легкое, сердце и легкое, яичники, конечности
Человек	Почки, костный мозг, поджелудочная железа, сердце, легкое, сердце и легкое, печень, кожа, роговица

¹ Виды, у которых, помимо аллотрансплантации, проведена ксенотрансплантация органов (выделено курсивом).

лофосфамидом или облучением. ЦС-А не только предупреждает развитие реакции ТПХ, но и не препятствует репопуляции лимфоидных органов и восстановлению Т-зависимых иммунных функций в значительно более ранние сроки по сравнению с наблюдаемыми у животных, не леченных этим препаратом. Установленная острая реакция ТПХ у крыс эффективно устраняется терапевтическими дозами ЦС-А, введение которого начинают через 2 нед после пересадки. По мере продолжения лечения животные выздоравливают и остаются нормальными. Этот терапевтический эффект препарата при острой реакции ТПХ подтвержден у человека.

На модели клеточно-опосредованного цитолиза *in vivo* у мышей, в которой специфическая сенсibilизация лимфоцитов индуцируется к клеткам-мишеням мастоцитомы, ЦС-А нарушает только фазу сенсibilизации, не влияя на цитолитические клетки-эффекторы. Вторичный ответ также чувствителен к действию ЦС-А. Таким образом, *in vivo* подавляется

развитие цитолитических клеток, сами же эффекторные клетки резистентны к действию препарата. Однако если фаза сенсibilизации в модели аллогенного трансплантата предварительно подавляется ЦС-А, после отмены которого происходит отторжение, то оно вполне контролируется последующим лечением ЦС-А.

Некоторые модели повышенной чувствительности замедленного типа, такие как кожная реакция на оксазолон у мышей или кожная реакция морских свинок на ДНХБ (1-хлор-0-2,3-динитробензол), подавляются ЦС-А, введенным в фазу сенсibilизации. Первичный и вторичный иммунные ответы подавляются дозозависимо. Однако в модели кожной контактной повышенной чувствительности к туберкулину у морских свинок введение ЦС-А одновременно с разрешающей дозой антигена (т.е. полностью сенсibilизированным животным) эффективно подавляет реакцию.

Экспериментальные аутоиммунные заболевания

В табл. 34 приведены результаты, полученные при профилактическом или терапевтическом применении ЦС-А на экспериментальных моделях аутоиммунных заболеваний.

В верхней части табл. 35 перечислено шесть моделей, в которых для увеличения иммуногенности антигена использовался полный адьювант Фрейнда. При профилактическом применении ЦС-А (т.е. при его введении перед сенсibilизацией) наблюдалось подавление начальных симптомов. Даже когда лечение не начинали до появления первых патологических симптомов (терапевтическое применение), введение ЦС-А успешно излечивало животных в большинстве моделей. Однако при прекращении лечения происходил рецидив экспериментального аллергического энцефаломиелимита, аллергического неврита и миастении гравис. Это связано главным образом с длительным медленным высвобождением антигена, смешанного с полным адьювантом Фрейнда. Возможно, подобное действие обусловлено невозможностью развития супрессорных механизмов после начала заболевания, поскольку ЦС-А предупреждает начальные этапы антигенной сенсibilизации в данных моделях. Остальные модели в нижней половине табл. 34 связаны с использованием методов сенсibilизации без применения полного адьюванта Фрейнда.

Таблица 34. Результаты, полученные при профилактическом (профил) или терапевтическом (терап) применении циклоспорина при экспериментальных аутоиммунных (аи) заболеваниях (заболевания человека, соответствующие экспериментальным моделям, указаны в скобках)

Экспериментальная модель	Вид	Профил/ Терап
Адьювантный артрит (ревматоидный артрит)	Крысы	+ / +
Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (множественный склероз)	Крысы, морские свинки, обезьяны	+ / + ¹
Экспериментальный аллергический неврит (синдром Гийена-Барре)	Крысы, морские свинки	+ / + ¹
Экспериментальный увеит (увеит)	Крысы	+ / +
Экспериментальная аи миастения гравис (миастения гравис)	Крысы	+ / + ¹
Нефрит Хеймана (иммунный нефрит)	Крысы	+ / -
Экспериментальный аи тиреоидит (болезнь Граве, тиреоидит Хашимото)	Крысы	Нд / + ¹
Спонтанный аи тиреоидит (тиреоидит Хашимото)	Цыплята	- / Нд
Спонтанный аи диабет (юношеский диабет I типа)	Крысы ВВ	+ / -
Диабет, индуцированный вирусом ЕМС (инсулинзависимый диабет)	Мыши	- / -
Аи волчанка мышей (системная красная волчанка)	NZB/W	+ / +
Аи лимфопролиферативное (lpr) заболевание мышей (системная красная волчанка, артериит, артрит)	MRL/lpr	+ / Нд

¹ Восстановление симптомов после прекращения лечения циклоспорином.

Нд-нет данных.

ЦС-А эффективен в профилактике аутоиммунных заболеваний. При экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ) патологическая картина демиелинизации напоминает таковую при постинфекционном энцефаломиелите или при рассеянном склерозе у человека. ЦС-А предупреждает развитие ЭАЭ у крыс, морских свинок и макаков резусов при его введении в фазу сенсibilизации. ЦС-А также обладает заметным терапевтическим эффектом у сенсibilизированных животных (т.е. когда введение препарата начинают при первых симптомах паралича). Животные вскоре выздоравливают, но рецидивы ЭАЭ часто возникают при прекращении лечения. Если донорские клетки активируются *in vitro* специфическим антигеном или митогеном, то ЭАЭ

может быть перенесен от сенсibilизированных животных изоличным реципиентам. Если ЦС-А присутствует в течение всего 72-часового инкубационного периода, то пролиферация донорских клеток значительно подавляется и пассивный перенос ЭАЭ такими клетками у крыс невозможен. Более того, ЦС-А эффективен и при сверхострой форме ЭАЭ у крыс.

Сходные положительные результаты применения ЦС-А получены у крыс с аутоиммунным увеитом, индуцированным очищенным антигеном сетчатки млекопитающих. Кроме того, препарат оказался эффективным при экспериментальном аллергическом неврите у морских свинок, при нефрите Neumann и артритах, индуцированных адьювантом Фрейнда и коллагеном II типа. В отличие от хронического воспаления, в котором участвуют лимфоциты, при острых воспалительных процессах ЦС-А полностью неактивен.

При экспериментальных аутоиммунных тиреоидитах, индуцированных у крыс тимэктомией и облучением, лечение ЦС-А приводит к значительному улучшению состояния заболевших животных, что подтверждается падением уровня антитиреоглобулиновых антител и ассоциированной нормализацией отношения Т_п:Т_с (Т₄:Т₈) в ходе лечения. Прекращение введения препарата приводит к рецидиву. С другой стороны, попытки предупреждения развития спонтанных аутоиммунных тиреоидитов у цыплят тучной породы оканчиваются неудачей, а раннее лечение эмбрионов усугубляет заболевание.

Недавно получены убедительные результаты профилактического и терапевтического применения ЦС-А у мышей (NZB/NZW)_{F1} со спонтанным развитием аутоиммунного заболевания, проявляющегося гемолитической анемией, появлением антител к ДНК и протеинурии, которое напоминает системную красную волчанку у людей.

Супрессивные эффекты *in vivo*

Все доступные экспериментальные данные указывают на то, что ЦС-А действует специфически и обратимо именно на лимфоциты, поскольку до сих пор не обнаружено функционального влияния этого препарата на гемопоэтические, фагоцитарные и опухолевые клетки. ЦС-А подавляет пролиферативный ответ лимфоидных клеток, активированных *in vivo*

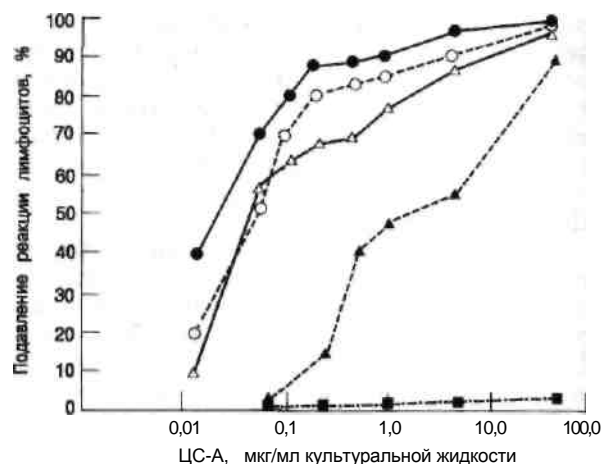


Рис. 113. Дозозависимое ингибиторное влияние ЦС-А на пролиферативный ответ лимфоцитов человека при различных стимулах.

Темные кружки-первичная реакция смешанных лимфоцитов; светлые кружки-вторичная реакция смешанных лимфоцитов; светлые треугольники-конканавалин-А; темные треугольники-фитогемагглютинин; темные квадраты - клеточно-опосредованный лимфоцитоз.

многими антигенами. Поликлональная активация лектинами, такими как конканавалин А, фитогемагглютинин и митоген лаконоса, а также антигенспецифическая активация (например, эритроцитами барана в системе Mishell-Dutton или аллоантигенными стимулирующими клетками в реакции смешанных лимфоцитов) почти полностью подавляются соответствующими концентрациями ЦС-А. 50% подавляющая концентрация (IC₅₀) варьирует от 20 до 500 нг/мл в зависимости от используемых митогенов и видов животных. На рис. 113 показано дозозависимое ингибиторное влияние ЦС-А на пролиферативную реакцию человеческих лимфоцитов в ответ на различные стимулы. Ингибируется как первичная, так и вторичная реакция смешанных лимфоцитов, а также индукция цитолитических лимфоцитов; однако на клеточно-опосредованный лимфоцитоз и индукцию активности супрессорных клеток препарат не влияет (частично показано на рис. 113).

В отличие от других супрессивных препаратов, таких как азатиоприн и колхицин, ЦС-А угнетает преимущественно Т-клетки, хотя в более высоких концентрациях он может также подавлять функции В-клеток. Так, активация В-клеток липополисахаридными антигенами

(Т-независимый митоген) слабо нарушается концентрациями препарата, которые блокируют стимуляцию Т-клеток конканавалином А (Т-зависимый митоген). Более того, ЦС-А отменяет выделение лимфокинов (таких как у-интерферон), фактора активации макрофагов и ростового фактора Т-клеток - интерлейки-на-2.

Ингибирующий эффект в значительной степени зависит от времени: процент подавления уменьшается пропорционально увеличению промежутка времени между внесением митогена и ЦС-А в культуру. Таким образом, препарат влияет на ранние клеточные события, происходящие в иммунокомпетентных лимфоцитах в ответ на митогенные стимулы, останавливая лимфоциты в фазе G_0 или в ранней фазе G_1 клеточного цикла. Более того, эффект препарата полностью обратим. ЦС-А сам по себе не обладает агглютинирующим, цитолитическим или стимулирующим действием на лимфоциты.

Механизм действия

ЦС-А подавляет широкий спектр реакций, в которых критическую роль играют иммунокомпетентные клетки. Характер событий, происходящих в лимфоцитах при контакте с ЦС-А, остается не вполне ясным. Все доступные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что соединение обладает специфическим и обратимым действием на лимфоциты. Какова же основа специфичности действия ЦС-А на лимфоидные клетки?

На основании множества данных, полученных как *in vitro*, так и *in vivo*, было сделано предположение, что препарат обратимо нару-

шает ранние этапы, следующие непосредственно за распознаванием антигена или митогена. В результате этого Т-клетки остаются в состоянии покоя и неспособны к трансформации и выделению лимфокинов, а следовательно, к индукции и поддержанию иммунного ответа. Кроме того, доказано, что ЦС-А может столь же эффективно подавлять начавшиеся иммунные реакции, например криз отторжения или аутоиммунный рецидив. Этот терапевтический (в противоположность профилактическому) эффект может объясняться тем, что ЦС-А подавляет запускаемое антигенами выделение лимфокинов активированными клетками, а также вмешивается в активацию и рекруитмент других эффекторных клеток.

Иммунофармакология *in vitro*

Уже в ранних исследованиях отмечалось слабое влияние ЦС-А на гемопоэтические ткани и функции лейкоцитов (кроме лимфоцитов). Обнаружение *in vivo* и *in vitro* обратимости его иммунодепрессивной активности показало, что влияние на лимфоциты не связано с лимфотоксическим действием, например с антимиотическим эффектом. Известно, что соединением главным образом подавляет хелперную функцию, т.е. способность Т-клеток синтезировать и выделять ИЛ-2 (рис. 114). Хотя ЦС-А нарушает синтез и некоторых других лимфокинов, он не изменяет их действия на лимфоциты-мишени, например на ИЛ-2-зависимую пролиферацию Т-клеток или на миграционную активность гранулоцитов или макрофагов и выделение монокинов.

Стадии трансформации покоящихся Т-клеток (Т) в активированные Т-клетки (Т'), имеющие рецепторы к ИЛ-2, и функции этих Т'-кле-

Рис. 114. Активация Т-клеток.

Связывание антигена с Т-клетками не приводит к их активации. Она наблюдается только при передаче двух сигналов реактивным Т-клеткам. Связывание рецепторов Т-клеток с антигеном представляет антигенный сигнал, а макрофаг (МФ) продуцирует индуктивную молекулу, МФ-костимулирующую активность, которая является вторым сигналом (интерлейкин-1, ИЛ-1) для Т-клеточной активации. Взаимодействие с регуляторными структурами на поверхности антигенпрезентирующих клеток обуславливает начало выделения ИЛ-1.

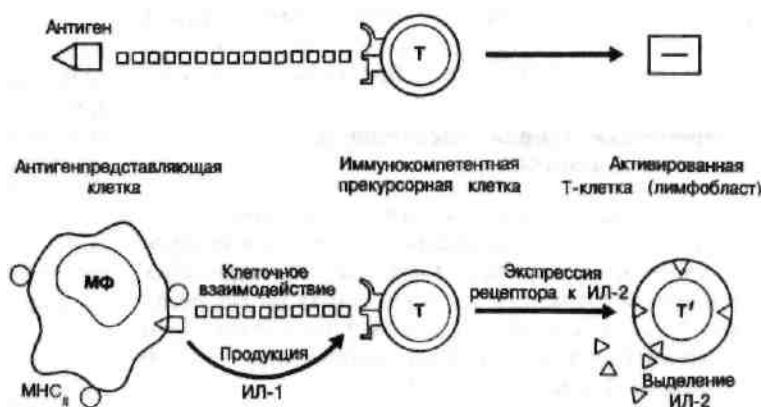


Таблица 35. Этапы перехода покоящихся Т-клеток (Т) в активированные Т-клетки (Т')

Реакция	Чувствительность к циклоспорино
Реакция А: Первичная активация $T \xrightarrow{(1)} T'$ $T \xrightarrow{(2)} T'$	+
Реакция Б: Клональная экспансия $T' \xrightarrow{(2)} nT'$	-
Реакция В: Запуск выделения лимфокинов $T' \xrightarrow{(1)} L$	+
Реакция Г: Цитотоксическая эффекторная функция $T'_c \text{ - экспрессия цитотоксичности}$	-

ток, такие как образование лимфокинов, обладают различной чувствительностью к ЦС-А (табл. 35).

В этих реакциях сигнал 1 обеспечивается антигеном или митогеном, связывающимся с рецептором на поверхности Т-клеток, а сигнал 2-костимулирующей активностью, например ИЛ-1 или другими постулируемыми продуктами антигенпредставляющих клеток. Реакция Б опосредуется продуктом Т-клеток- ИЛ-2 или ростовым фактором Т-клеток. ЦС-А оказывает влияние на реакцию В при концентрации 5-100 нг/мл, но не влияет на реакцию Б при концентрации ниже 5-10 мкг/мл. Цитолитическая эффекторная функция цитотоксических Т-клеток (Т'ц) полностью резистентна к ЦС-А (реакция Г).

Реакцию А анализировать трудно ввиду ее многофакторности. Несовпадение результатов, полученных в разных лабораториях, может отчасти объясняться вовлечением множества взаимодействий в процесс превращения Т в Т'.

Современные теории, касающиеся биологии Т-клеток

В настоящее время достигнуто полное согласие относительно активации, клональной пролиферации и запуска Т-клеток, обладающих хелперной функцией, однако взгляды на реакцию других клеток на ЦС-А расходятся. Эти расхождения привели к созданию двух теорий биологии Т-клеток.

Сигнальная модель предполагает, что все Т-клетки физиологически одинаковы и обладают сходным эффекторным потенциалом. Согласно этой гипотезе, ЦС-А повреждает все Т-клетки в одинаковой степени, а проявление разных функций клеток регулируется различной рецепторной чувствительностью к препарату.

Субпопуляционная теория постулирует, что ЦС-А различает две субпопуляции Т-клеток: чувствительные (среди них хелпер-ные клетки и предшественники цитотоксических клеток) и нечувствительные (некоторые супрессорные и все цитотоксические клетки) к препарату.

В настоящее время на основании имеющихся знаний нельзя отвергнуть какую-либо из этих моделей, поэтому для окончательного выбора между ними необходима дальнейшая экспериментальная работа. Наконец, предполагается, что ЦС-А может изменять функцию В-клеток таким же образом, как и в случае Т-клеток. Согласно сигнальной модели, ЦС-А различает В-клетки на разных стадиях дифференциации на пути к синтезу иммуноглобулинов, а по субпопуляционной теории, к препарату чувствительны В-клетки только одной из нескольких физиологически различных субпопуляций.

Действие ЦС-А на молекулярном уровне

Выдвижение предположений относительно механизма действия ЦС-А, который, несмотря на значительный прогресс, остается в значительной степени гипотетическим, представляется нам рискованным, хотя и заманчивым. Более того, молекулярная биология активации лимфоцитов, пролиферации и созревания сама по себе еще далека от полного понимания. Ввиду бесспорной селективной активности ЦС-А в отношении лимфоцитов наиболее обнадеживающим подходом к открытию механизма его действия является изучение клеточных функций, которые специфичны для лимфоцитов и отличаются от других, более общих событий, происходящих при активации клеток (рис. 115). В настоящее время наиболее привлекательным объяснением является то, что ЦС-А и пролактин связываются с одним и тем же (пока не идентифицированным) белком, который определенно отличается от структур, распознающих антиген, или от рецептора Т-клеток. После связывания ЦС-А интернализируется и концентрируется в цитоплазме, где он связывается

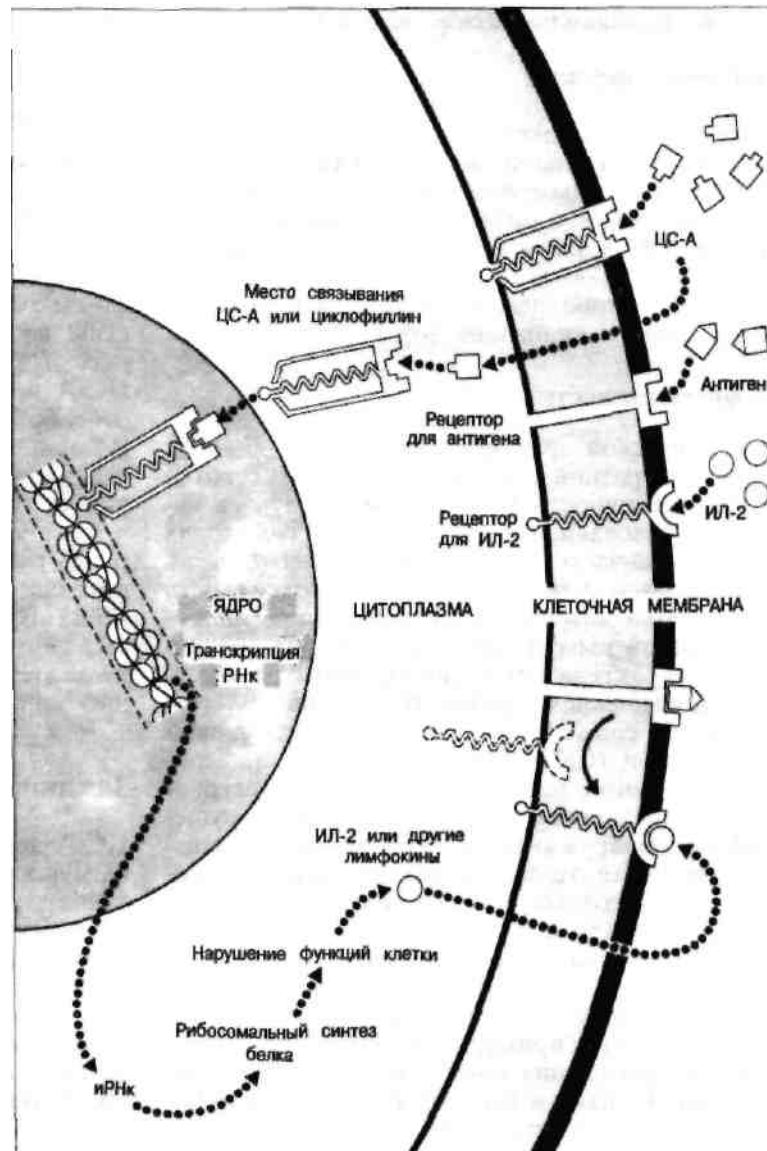


Рис. 115. Предполагаемый механизм действия ЦС-А.

с циклофилином. Этот процесс несколько напоминает реакции в случае стероидных гормонов. Оба соединения, по-видимому, располагают рецепторами в цитозоле и способны проникать в ядро, где ЦС-А, в частности, специфически подавляет транскрипцию иРНК, кодирующую лимфокины, но не иРНК для других белков. Этот процесс представляется критическим этапом в чувствительности клеток к ЦС-А, поскольку добавление препарата позже данной стадии (т.е. через 2-4 ч после стимуляции) является неэффективным и после-

дующая трансляция, как и синтез белка (лимфокина), протекает нормально. Достоинствами этой гипотезы являются ее простота и совместимость с рядом результатов *in vivo*, показывающих, что ЦС-А не только предупреждает первичную иммунизацию, но и способен остановить начавшуюся иммунную реакцию. Наиболее легко можно наблюдать при подавлении длительного выделения лимфокинов, а также при супрессии дальнейшей активации и рекрутирования эффекторных клеток.

Другие фармакологические эффекты

Побочные эффекты

В связи с относительно небольшой разницей между эффективной и токсической дозами большинства иммунодепрессантов необходимо отметить, что по этому отношению между дозами ЦС-А значительно превосходит другие препараты. Соответственно этому, побочные эффекты у животных минимальны в иммунодепрессивном диапазоне доз.

Нефротоксичность

В клинической практике описан ряд побочных эффектов разной степени тяжести и частоты. Нефротоксичность в большинстве случаев является дозозависимой. В том случае, когда ЦС-А назначается в низких дозах и его уровень постоянно контролируется, нефротоксичность не является лимитирующим фактором циклоспориновой иммунодепрессии. Острая токсичность характеризуется дозозависимым быстрым повышением уровня креатинина в сыворотке и снижением скорости клубочковой фильтрации (СКФ). Уменьшение СКФ, вероятно, связано с пре клубочковой вазоконстрикцией. Характерных морфологических нарушений не обнаруживается. Тубулярные изменения, включая тельца и вакуоляризацию, наблюдаются только при токсических концентрациях препарата.

Хроническая токсичность может развиваться при длительном введении низких доз ЦС-А, а также при его комбинации со стероидами. СКФ снижается примерно на одну треть, дальнейшего ухудшения почечной функции не происходит. Однако в некоторых случаях наблюдается прогрессивное течение циклоспориновой нефротоксичности, которая сопровождается изменениями в артериолах и наличием полосок фиброза в биоптатах почек. Если уменьшение доз ЦС-А не приводит к улучшению функции почек, следует перейти к обычной иммунодепрессии. Следует избегать введения потенциально нефротоксичных препаратов; необходимо также учитывать взаимодействие лекарств.

Меньшее значение имеют легкая гепатотоксичность и такие симптомы, как анорексия, летаргия, гирсутизм, тремор, гипертрофия десен, тошнота и диарея. Побочные эффекты, наблюдаемые достаточно редко при использовании ЦС-А, в большинстве своем дозоза-

висимы и обратимы (при снижении дозы или отмене препарата).

Лимфомы

Лимфомы диагностированы у 50 из 12000 больных, перенесших трансплантацию почек до 1985 г. Однако их частота остается на уровне 0,4%; в большинстве случаев, помимо ЦС-А, использовались другие иммунодепрессанты. Согласно длительным токсикологическим исследованиям на разных видах животных и другим специальным исследованиям, ЦС-А не обнаруживает канцерогенности и не способствует метастазированию опухолей. В большинстве случаев (если не во всех) наличие злокачественных новообразований коррелирует с чрезмерным иммунодепрессивным режимом лечения, который, как известно, нарушает механизмы иммунного надзора. Так, показано, что индуцированная вирусом Эпш-тейна-Барра пролиферация В-клеток усиливается в присутствии ЦС-А, возможно, в результате подавления Т-клеток, осуществляющих контроль пролиферации В-клеток.

Заключение

ЦС-А является прототипом нового поколения иммунодепрессантов. Это, в частности, связано с уникальной природой его механизма действия. Препарат не влияет на созревание стволовых клеток до состояния антигенчувствительных клеток-предшественников. И только когда зрелые иммунокомпетентные Т-клетки получают активирующий их сигнал от антигена на антигенпредставляющей клетке, ЦС-А блокирует последующие этапы активации, такие как транскрипция иРНК, кодирующей лимфокины, секреция лимфокинов, пролиферация и созревание. В результате этого эффекторные клетки не образуются. Более того, ЦС-А влияет на функции некоторых активированных или эффекторных клеток. Ингибирующий эффект препарата обратим.

ЦС-А подавляет гуморальный и клеточный иммунитет и эффективен при хроническом воспалении. Препарат наиболее активен при его введении во время индуктивной фазы иммунного ответа (сенсбилизация). Кроме того, ЦС-А подавляет эффекторную фазу при кризе отторжения, при реакции «трансплантат против хозяина» и экспериментальных аутоим-

мунных заболеваниях. Его действие специфично и не распространяется на функции макрофагов и гемопоэтических органов.

Этот новый механизм действия позволяет ЦС-А заполнить важный терапевтический пробел в области трансплантации органов. Однако потенциал препарата может быть полностью оценен только при исследовании возможностей его применения при аутоиммунных заболеваниях.

Интересно то, что ЦС-А необходим не только как лекарственный препарат, но и как весьма важный инструмент фундаментальных иммунологических исследований.

N. В. Циклоспорин известен в Европе и США как cyclosporins

Дж. Л. Турк (J. L. Turk)

Введение

Широкий класс веществ был исследован с целью выявления и оценки иммуносупрессивной активности. Главным стимулом в этой работе явилась необходимость подбора оптимальной схемы подавления отторжения трансплантата, а также приживления пересаженного костного мозга. Кроме того, как было отмечено ранее, основным побочным эффектом противоопухолевой терапии является снижение сопротивляемости организма инфекциям. Таким образом, большое число препаратов, первоначально использовавшихся как противоопухолевые, были исследованы как потенциальные иммунодепрессанты и в качестве таковых применены в клинике. Препарат, клинически используемый для подавления иммунных реакций, в идеале должен отвечать пяти требованиям.

1. Интервал между токсическим и терапевтическим эффектом препарата должен быть достаточно большим.

2. Препарат должен обладать избирательным действием на лимфоциты и не вызывать повреждения других клеток организма.

3. Действие препарата (если возможно) должно быть направлено только на клетки, принимающие специфическое участие в конкретном иммунном процессе.

4. Препарат должен вводиться в течение ограниченного периода времени до тех пор, пока иммунные процессы не воспримут чужеродный антиген как часть «своего». После этого возможно уменьшение дозы, а затем и отмена препарата, если организм способен поддерживать собственную иммунную защиту от инфекций.

5. Он должен быть эффективным и против уже развившихся иммунных процессов.

Внедрение цитотоксических препаратов и антиметаболитов в 50-х годах привело к ряду исследований их влияния на иммунный ответ. Поскольку многие из этих препаратов внедрялись с целью контроля пролиферации неопластических клеток, наиболее разумным пред-

ставлялось изучение их действия на эквивалентных пролиферативных процессах иммунного ответа. Многие исследователи предполагали, что действие таких соединений на опухолевые и иммунокомпетентные клетки идентично. В других исследованиях действие подобных агентов на пролиферирующие опухолевые клетки даже не исследовалось, а изучалось на таких обычных биохимических моделях, как крысиная печень или костный мозг цыплят. Действие препаратов на такие нормальные непролиферирующие ткани затем экстраполировалось для объяснения влияния на ферментативные системы пролиферирующих раковых клеток и, в конце концов, на иммунный ответ. Многие из изученных соединений влияют одновременно на ряд различных биохимических обменных процессов. Особым примером может служить ситуация, когда препарат оказывает центральное влияние на пролиферацию лимфоцитов, одновременно обладая противовоспалительными эффектами в отношении периферических проявлений иммунных реакций. Такие периферические противовоспалительные эффекты отмечены не только для алкилирующих препаратов и тиопуринов, но и для антилимфоцитарного глобулина (АЛГ).

В настоящее время иммуносупрессанты разделяют на следующие группы: а) алкилирующие агенты; б) тиопурины; в) антиметаболиты; г) продукты грибов, включая циклоспорин; д) кортикостероиды; е) АЛГ. Кортикостероиды и циклоспорин детально описаны в главах 24 и 26. В данной главе основное внимание уделено различным аспектам действия алкилирующих агентов и тиопуринов. Одним из недавних достижений является обнаружение того, что супрессия одной субпопуляции лимфоцитов может привести к общему усилению иммунного ответа. В связи с этим в данной главе рассматривается и ряд соединений, проявляющих чрезвычайную активность в повышении противоопухолевого иммунитета и называющихся «модификаторами биологического ответа».

Алкилирующие агенты

Действие алкилирующих агентов заключается в замещении химических групп в биологически активных молекулах, особенно в нуклеиновых кислотах и ферментах. При замещении алкильными группами в молекуле ДНК действие алкилирующих агентов проявляется как антимитотическое. При этом они нарушают порядок расположения оснований в молекуле ДНК, образуя мостики вдоль различных участков ее спирали или разрушая молекулу. В этом случае повреждается матрица для репликации ДНК и формирования информационной РНК.

Простейшим по химической структуре представителем группы препаратов является азотистый иприт (рис. 116), который имеет две реакционноспособные боковые цепи, содержащие атомы хлора. Сходные структуры имеют и другие биологически активные агенты: а) мелфалан, L-фенилаланин-иприт; б) хлорамбуцил, аминоксифенбутировая кислота иприта; в) бусульфан, метансульфоновая кислота.

Циклофосфамид, наиболее активное соединение в этой серии, является диаמידным эфиром фосфорной кислоты (рис. 117).

Циклофосфамид- наиболее исследованный модификатор биологических ответов; его различные влияния на субпопуляции лимфоцитов являются основой для дальнейшего изучения ряда других соединений.

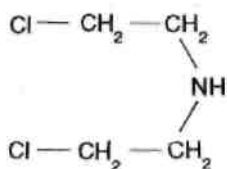


Рис. 116. Азотистый иприт.

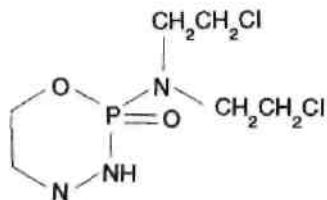


Рис. 117. Циклофосфамид.

Циклофосфамид

Циклофосфамид (ЦФ) сам по себе *in vitro* не обладает цитотоксическим действием, но его метаболиты, образующиеся в печени (альдофосфамид и карбоксифосфамид) принадлежат к главным алкилирующим и цитотоксическим веществам. Время полураспада ЦФ в плазме человека составляет менее 6,5 ч, а у крыс элиминация происходит еще быстрее; однако коренных различий в процессе активации препарата у человека и некоторых видов животных не обнаруживается. В крови крыс алкилирующее действие ЦФ достигает своего максимума через 30 мин после введения препарата, а через 4 ч оно возвращается к нулевому значению.

Хотя ЦФ неактивен *in vitro*, его можно активировать в присутствии микросом печени. Одним из его наиболее активных метаболитов является 4-гидропероксициклофосфамид (4-ГЦ).

В настоящее время многие исследователи используют 4-ГЦ для изучения механизма действия ЦФ *in vitro*.

Исследование механизмов действия ЦФ *in vivo* ограничено и осуществляется главным образом на экспериментальных моделях (мыши и морские свинки). Однако в связи с увеличением доступности 4-ГЦ стало возможным распространение таких исследований на ткани человека. Первоначально предполагалось, что действие ЦФ обусловлено сильной антипролиферативной активностью препарата. Это подтверждалось исследованиями, показавшими мощное подавление продукции антител и нарушение функции Т-клеток при введении ЦФ в пролиферативную фазу иммунного ответа. Продукция антител подавлялась и в случае введения ЦФ перед сенсibilизацией. Предполагалось, что предшественники клеток, продуцирующих антитела, чувствительны к ЦФ, поскольку они являются быстропролиферирующей клеточной популяцией, тогда как предшественники Т-клеток относятся к долгоживущей и медленно обновляющейся популяции. Эта концепция подтверждена исследованиями с использованием маркеров Т-клеток у мышей и гистологическим анализом лимфоидной ткани. После введения ЦФ увеличивалось относительное количество Т-клеток; исчезновение В-клеток на срезах лимфатических узлов и селезенки определялось визуально.

Исходя из этих наблюдений, ЦФ в одно-

кратной большой дозе (300 мг/кг) был использован для изучения регуляции Т-клеток *in vivo*. Обнаружено, что многие функции Т-клеток могут быть усилены предварительным введением ЦФ. К ним относятся аллергическая контактная чувствительность к простым гаптенам и повышенная чувствительность замедленного типа Jones-Mote у морских свинок и мышей. В опытах с морскими свинками получены доказательства существования В-клеток-супрессоров, регулирующих реакции, чувствительные к ЦФ. У мышей препарат повреждает как Т-, так и В-супрессорные клетки. Однако у мышей усиливающие эффекты ЦФ наблюдаются при значительно более низкой дозе (50 мг/кг), при которой функция В-клеток не нарушается. Более того, установлено, что влияние предварительного введения ЦФ на гиперсенситивность замедленного типа (ГЗТ) у мышей зависит прежде всего от уровня индуцированного иммунного ответа и в меньшей степени от типа антигена или дозы ЦФ. Так, сильные реакции ГЗТ на эритроциты барана и на антиген главного комплекса гистосовместимости подавляются, тогда как слабые усиливаются предварительным введением ЦФ. Возможно, это связано с тем, что слабые реакции в процессе развития подвергаются сильной регуляции, а ЦФ снимает регуляцию.

Во многих изученных системах ответ антител подавляется предварительным введением ЦФ. Однако описан ряд систем, в которых уровень антител повышается параллельно ГЗТ. ЦФ также облегчает продукцию антител в моделях с полным подавлением клеточно-опосредованного иммунитета. В этих моделях антитела в норме не продуцируются на несущий белок, когда его поверхностные рецепторы полностью замещены гаптенем. Тем не менее антитела к носителю могут обнаруживаться в этой модели, если животному предварительно вводится ЦФ. В дальнейшем ЦФ может полностью отменить иммунологическую толерантность, если она индуцирована Т-клетками-супрессорами. Однако этот эффект является временным и толерантность восстанавливается по мере регенерации супрессорных клеток.

Внедрение и использование 4-ГЦ *in vitro* позволили провести более точный анализ действия ЦФ. Очень скоро выяснилось, что действие 4-ГЦ особенно сильно отражается на популяции клеток Т-супрессоров. Индуцированная конканавалином А Т-супрессия дифферен-

циации В-клеток полностью отменяется одночасовой обработкой Т-клеток низкими концентрациями 4-ГЦ (0,01-20 мкМ). При таких концентрациях перекрестные сшивки ДНК имеются лишь в незначительном количестве или вовсе отсутствуют, а бластогенез не уменьшается.

Функции регуляторных Т-клеток (индукторов и супрессоров), которые являются CD4-положительными и CD8-отрицательными, более чувствительны к ингибиторным эффектам 4-ГЦ, чем функции цитотоксических эффекторных предшественников. Наибольшей чувствительностью к 4-ГЦ (≤ 20 мкМ) обладают индуцированные конканавалином А предшественники супрессорных клеток, тогда как индукторы первичных и вторичных цитотоксических Т-лимфоцитов чувствительны только к концентрациям в диапазоне 20-40 мкМ, а супрессорные эффекторы резистентны к ингибиторным эффектам вплоть до 100 мкМ 4-ГЦ.

Поскольку перекрестное сшивание ДНК не наблюдается при концентрациях 4-ГЦ ниже 20 мкМ, для объяснения влияния препарата на предшественники супрессорных клеток предполагается наличие иного механизма. Более того, предполагается даже отсутствие связи иммуномодулирующих эффектов ЦФ с действием препарата на нуклеиновые кислоты. Вероятно, что ЦФ индуцируют появление новых антигенных структур, обуславливающих генерирование аутореактивных цитолитических клеток. Эти неоантигены могут быть продуктами реактивированных вирусов или антигенами, найденными на более примитивных клетках-предшественниках.

Теория модификации клеточной поверхности (независимо от предполагаемого механизма) должна получить экспериментальное подтверждение.

Хотя ЦФ и 4-ГЦ были внедрены и изучены благодаря их способности уменьшать интенсивность антителообразования, только исследования, выявившие усиление под их действием Т-клеточных ответов, продемонстрировали ценность этих препаратов как модификаторов биологических ответов. Как показывают исследования двух последних десятилетий, данные препараты служат мощным инструментом изучения механизмов иммунорегуляции.

Никакие другие алкилирующие агенты не обладают столь сильным действием, как ЦФ. У морских свинок аналогичное, но менее сильное действие проявляет мелфалан. Рядом ав-

торов было изучено (главным образом на мышцах) модифицирующее влияние ЦФ на противоопухолевые ответы. В некоторых моделях ЦФ, введенный перед трансплантацией опухоли, приводит к более сильному и длительному цитотоксическому эффекту и повышению противоопухолевого иммунитета. Мыши, неспособные к какому-либо опухолевым нейтрализующему ответу, приобретали эту способность в результате предварительного введения ЦФ. Такой результат достигался однократным введением низкой дозы препарата (50-100 мг/кг). Эффективные дозы в данном случае были значительно ниже тех, которые обладают каким-либо прямым действием на пролиферирующие опухоли и схемы введения которых не обеспечивают эффективного уровня препарата к моменту трансплантации опухоли. В одном из исследований мышью-опухоленосителями, получившие лечение низкими дозами препарата, были способны отторгать трансплантат с 300 минимальными летальными дозами опухолевых клеток вплоть до 31-го дня после введения ЦФ.

Тиопурины

Основными из используемых тиопуринов являются 6-меркаптопурин (6-МП) (рис. 118) и азатиоприн (АЗ) (рис. 119). Эти соединения относятся к аналогам пурина (гуанина). Ранее предполагалось, что они действуют как «ложные основания», включающиеся в ДНК. В действительности они влияют на синтез нуклеиновых кислот через анаболические ферменты пурина. На клеточном уровне эти вещества подавляют синтез белка. Многие исследования посвящены влиянию 6-МП и АЗ на Т-клеточный иммунитет *in vivo* и *in vitro*. Тиопурины относятся к сильнодействующим противовоспалительным препаратам. Предполагается, что их противовоспалительное действие связано с подавлением медиаторов, в норме выделяемых гранулоцитами. В то же время ряд экспериментальных работ, выполненных *in vitro*, свидетельствует о подавлении этими препаратами пролиферации лимфоцитов в ответ на специфический антиген (туберкулиновый ППД) или в реакции смешанных лимфоцитов.

Тиопурины изучены на мышях и кроликах, у которых они увеличивают время приживления кожного трансплантата, что сопровож-

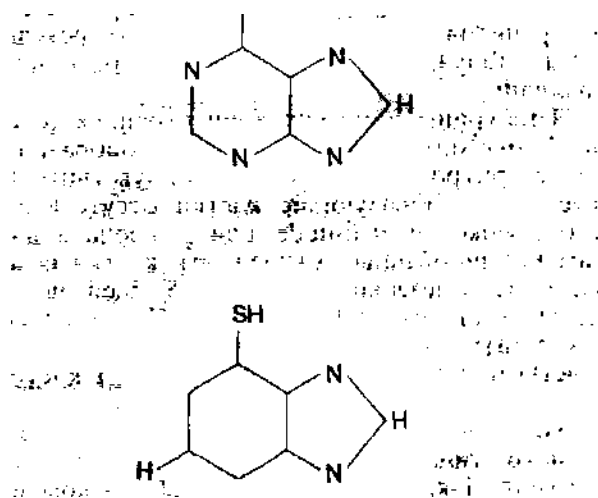


Рис. 118. Гуанин-6-меркаптопурин.

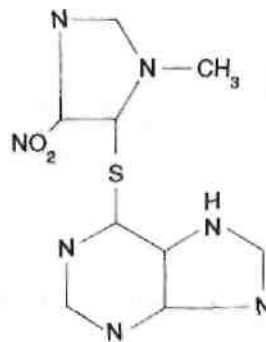


Рис. 119. Азатиоприн.

дается подавлением пролиферации Т-клеток в дренирующих лимфатических узлах. Они также активны в отношении гуморального ответа. Так, 6-МП, введенный одновременно с иммунизацией кроликов бычьим альбумином, подавляет антителообразование с формированием иммунологической толерантности.

АЗ и 6-МП *in vitro* подавляют в лимфоцитах синтез белка, ДНК и РНК. *In vivo* оба препарата уменьшают содержание ДНК и РНК в тимусе и селезенке, снижают скорость синтеза IgG и IgM, вызывая падение общего уровня иммуноглобулина. В то же время препараты оказывают лишь слабое влияние на уровень лимфоцитов периферической крови. АЗ подавляет ФГА-индуцированную трансформацию лимфоцитов, а также реакцию смешанных лимфоцитов. Однако подавление

ими антигениндуцированной трансформации лимфоцитов происходит нерегулярно; результаты, получаемые в разных лабораториях, различны.

Тиопурины в низких концентрациях (около 1 мкг/мл) подавляют Т-розеткообразование с эритроцитами барана. АЗ-чувствительные розеткообразующие клетки отсутствуют в селезенке мышей-nude или у неонатально тимэктомированных мышей; эти клетки исчезают из селезенки в течение 5 дней после тимэктомии взрослых особей. Приведенные результаты свидетельствуют о различной чувствительности субпопуляций Т-клеток к АЗ.

При повышенной чувствительности замедленного типа и отторжении трансплантата функция Т-клеток подавлена. До открытия циклоsporина АЗ был основным препаратом, используемым для предотвращения отторжения трансплантата. Однако терапевтический индекс препарата в отношении доз, применяемых при кризе отторжения, и доз, при которых возникают инфекционные осложнения, очень мал, поэтому риск инфекции оппортунистическими микроорганизмами, такими как *Candida*, цитомегаловирус и *Pneumocystis carinii*, значителен. Следует отметить, однако, что риск тяжелой оппортунистической инфекции существует у всех больных, у которых клеточно-опосредованный иммунитет подавлен любой формой иммунодепрессивной терапии.

У больных с почечной трансплантацией, которые получали АЗ одновременно со стероидами, а иногда и антилимфоцитарный иммуноглобулин, лимфомы возникали чаще, чем в общей популяции. Частота возникновения опухолей у больных, получавших иммунодепрессивную терапию, включая АЗ, после трансплантации составляет 2-13%. В 60% случаев опухоли представлены не ходжкинскими лимфомами, что в 45-60 раз превышает их уровень в нормальной популяции. В одном из исследований обнаружена лимфома, состоявшая преимущественно из пролиферирующих поликлональных В-клеток. Отмечается также повышение частоты саркомы Капоши: 0,6% всех злокачественных новообразований в нормальной популяции и 4,8%-у больных после трансплантации. Рак кожи встречается также часто, составляя 39% наблюдаемых злокачественных опухолей, среди которых с разной частотой отмечаются карциномы шейки матки, желудка и мочевого пузыря.

Антифолаты

Наиболее широко используемым антифолатом является метотрексат (МТ). Он связывается с ферментом редуктазой фолиевой кислоты, который превращает дигидрофолиевую кислоту в тетрагидрофолиевую. Тетрагидрофолиевая кислота в качестве кофермента участвует в превращении урацилдезоксирибозидов в тимидин; кроме того, она необходима для других ферментов, активно участвующих в обмене пурина и пиримидина.

Показано, что МТ подавляет образование антител и клеточно-опосредованного иммунитета, включая туберкулиновую реакцию и контактную чувствительность у некоторых видов животных.

У морских свинок используется ежедневная доза 12,5 мг/кг. Летальные дозы МТ (24 мг/кг) могут использоваться у морских свинок, если спустя 24 ч животным вводится 18 мг/кг фолиевой кислоты. В этих условиях возможно увеличение выживаемости кожного трансплантата.

Для тех же целей у мышей применяется цитроворум-фактор (ЦФр) (M^5 -формилтетрагидрофолат). Введение ЦФр используется для спасения аллогенного опухолевого иммунитета у мышей, получавших метотрексат. Однако в других моделях продукция антител была спасена с помощью ЦФр, введенного через 12 ч после МТ.

У морских свинок *in vivo* МТ не нарушает дифференциации Т-клеток в blasts, как, например, ЦФ или 6-МП, но избирательно блокирует развитие популяции небольших лимфоцитов, присутствующих в дренирующих лимфатических узлах у сенсibilизированных животных. МТ *in vivo* не блокирует синтеза ДНК, но нарушает синтез РНК и белка, а также ингибирует глюкозу-6-фосфатдегидрогеназу, АТФазу и щелочную фосфатазу. Предполагается, что эти эффекты могут быть вызваны МТ как хелатным агентом, способным к связыванию цинка, который необходим для действия ряда ферментов, включая дегидрогеназы.

Антибиотики с иммунодепрессивными свойствами

Антибиотики грибкового или бактериального происхождения обладают антибактериальным эффектом, нередко связанным с угнетением

синтеза нуклеиновых кислот или белка бактерий. Такой эффект часто не представляется специфичным для бактерий, а является общим биологическим феноменом. Некоторые антибиотики, сильные бактериостатические агенты, не стали лекарственными препаратами ввиду их токсичности. Часто эти соединения оказывались высокоактивными в отношении тканей с быстрым делением клеток у млекопитающих (таких как гемопоэтические или лимфоид-ные, которые пролиферируют в ответ на антигенный стимул), а также были способны подавлять неопластическую пролиферацию.

К этим препаратам относятся актиномицины, получаемые из культур *Streptomyces antibioticus*. Актиномицин С применялся в клинических исследованиях как иммуносупрессивный препарат при трансплантации. Предполагается, что актиномицины избирательно образуют комплексы с ДНК, подавляя таким образом синтез РНК и белка. Аналогичным препаратом является митомицин С, полученный из *Streptomyces caesiritosus*; он подавляет ДНК-зависимый синтез РНК. Этот препарат, также использовавшийся в клинике при злокачественных новообразованиях, блокирует функции Т-клеток в реакциях клеточно-опосредованного иммунитета. Обнаружено, что митомицин С усиливает резистентность в некоторых опухолевых моделях, причем эта устойчивость связана с проявлением «неспецифически» индуцированных Т-супрессорных клеток.

Хорошо известным антибиотиком, применяемым при инфекциях у людей, является хлорамфеникол. Препарат, первоначально выделенный из *Streptomyces venezuelae*, в настоящее время производится синтетически. Он останавливает синтез белка, блокируя присоединение РНК-матрицы к рибосомам. У экспериментальных животных хлорамфеникол (в достаточно высоких дозах) подавляет первичный гуморальный ответ. Кроме того, он блокирует вторичный ответ (даже при нормальном развитии первичного) и увеличивает время жизни кожного трансплантата.

Модификаторы биологического ответа

Национальный раковый институт (НРИ) США в 1978 г. ввел в употребление термин «модификаторы биологического ответа» (МБО). Эти

агенты определяются как вещества, способные изменять биологические реакции на опухолевые клетки, что обуславливает терапевтически благоприятный исход. Отдел по лечению рака НРИ разработал программу развития МБО.

К биологическим ответам, подлежащим модификации, относятся защитные реакции организма, которые могут быть изменены посредством усиления эффекторных механизмов или медиаторов. Ниже перечислены группы препаратов, которые включены в данную программу.

I. Препараты, повышающие противоопухолевый иммунитет, модулирующие компоненты иммунного ответа, индуцирующие или восстанавливающие эффекторы иммунитета.

II. Интерфероны и цитокины.

III. Тимические гормоны и факторы.

IV. Опухолеспецифические вакцины.

V. Иммунные эффекторы в виде клеток или антител.

В следующую группу МБО входят вещества, специфически влияющие на регуляцию иммунного ответа, особенно те, которые имеют отношение к супрессорным механизмам, действующим по типу обратной связи. Ряд препаратов в настоящее время находится в стадии исследований, проводящихся во всем мире с целью оценки способности тех или иных агентов усиливать иммунный ответ, причем многие из них относятся к антибиотикам, получаемым из *Streptomyces spp.*

Противоопухолевые препараты, усиливающие иммунный ответ

Адриамицин

Адриамицин (доксорубин) является аминокликозидным антибиотиком, первоначально выделенным из грибов *Streptomyces peucetius var. caesius*. При исследовании реакций организма на опухоли обнаружено, что адриамицин (АМ) селективно модулирует иммунный ответ. В ранних исследованиях показано, что АМ имеет большую эффективность в моделях с антигенными опухолями по сравнению с неантигенными моделями у мышей, а лечение антибиотиком приводит к значительному повышению клеточно-опосредованных цитотоксических ответов, что связано с усилением активности Т-клеток и макрофагов. В то же время выявлено подавление антителообразования и естественных клеток-киллеров (ЕКК).

ими антигениндуцированной трансформации лимфоцитов происходит нерегулярно; результаты, получаемые в разных лабораториях, различны.

Тиопурины в низких концентрациях (около 1 мкг/мл) подавляют Т-розеткообразование с эритроцитами барана. АЗ-чувствительные розеткообразующие клетки отсутствуют в селезенке мышей-nude или у неонатально тимэктомированных мышей; эти клетки исчезают из селезенки в течение 5 дней после тимэктомии взрослых особей. Приведенные результаты свидетельствуют о различной чувствительности субпопуляций Т-клеток к АЗ.

При повышенной чувствительности замедленного типа и отторжении трансплантата функция Т-клеток подавлена. До открытия циклоsporина АЗ был основным препаратом, используемым для предотвращения отторжения трансплантата. Однако терапевтический индекс препарата в отношении доз, применяемых при кризе отторжения, и доз, при которых возникают инфекционные осложнения, очень мал, поэтому риск инфекции оппортунистическими микроорганизмами, такими как *Candida*, цитомегаловирус и *Pneumocystis carinii*, значителен. Следует отметить, однако, что риск тяжелой оппортунистической инфекции существует у всех больных, у которых клеточно-опосредованный иммунитет подавлен любой формой иммунодепрессивной терапии.

У больных с почечной трансплантацией, которые получали АЗ одновременно со стероидами, а иногда и антилимфоцитарный иммуноглобулин, лимфомы возникали чаще, чем в общей популяции. Частота возникновения опухолей у больных, получавших иммунодепрессивную терапию, включая АЗ, после трансплантации составляет 2-13%. В 60% случаев опухоли представлены неходжкинскими лимфомами, что в 45-60 раз превышает их уровень в нормальной популяции. В одном из исследований обнаружена лимфома, состоявшая преимущественно из пролиферирующих поликлональных В-клеток. Отмечается также повышение частоты саркомы Капоши: 0,6% всех злокачественных новообразований в нормальной популяции и 4,8%-у больных после трансплантации. Рак кожи встречается также часто, составляя 39% наблюдаемых злокачественных опухолей, среди которых с разной частотой отмечаются карциномы шейки матки, желудка и мочевого пузыря.

Антифолаты

Наиболее широко используемым антифолатом является метотрексат (МТ). Он связывается с ферментом редуктазой фолиевой кислоты, который превращает дигидрофолиевую кислоту в тетрагидрофолиевую. Тетрагидрофолиевая кислота в качестве кофермента участвует в превращении урацилдезоксирибозиды в тимидин; кроме того, она необходима для других ферментов, активно участвующих в обмене пурина и пиримидина.

Показано, что МТ подавляет образование антител и клеточно-опосредованного иммунитета, включая туберкулиновую реакцию и контактную чувствительность у некоторых видов животных.

У морских свинок используется ежедневная доза 12,5 мг/кг. Летальные дозы МТ (24 мг/кг) могут использоваться у морских свинок, если спустя 24 ч животным вводится 18 мг/кг фолиевой кислоты. В этих условиях возможно увеличение выживаемости кожного трансплантата.

Для тех же целей у мышей применяется цитроворум-фактор (ЦФр) (N⁵-формилтетрагидрофолат). Введение ЦФр используется для спасения аллогенного опухолевого иммунитета у мышей, получавших метотрексат. Однако в других моделях продукция антител была спасена с помощью ЦФр, введенного через 12 ч после МТ.

У морских свинок *in vivo* МТ не нарушает дифференциации Т-клеток в blasts, как, например, ЦФ или 6-МП, но избирательно блокирует развитие популяции небольших лимфоцитов, присутствующих в дренирующих лимфатических узлах у сенсibilизированных животных. МТ *in vivo* не блокирует синтеза ДНК, но нарушает синтез РНК и белка, а также ингибирует глюкозу-6-фосфатдегидрогеназу, АТФазу и щелочную фосфатазу. Предполагается, что эти эффекты могут быть вызваны МТ как хелатным агентом, способным к связыванию цинка, который необходим для действия ряда ферментов, включая дегидрогеназы.

Антибиотики с иммунодепрессивными свойствами

Антибиотики грибкового или бактериального происхождения обладают антибактериальным эффектом, нередко связанным с угнетением

синтеза нуклеиновых кислот или белка бактерий. Такой эффект часто не представляется специфичным для бактерий, а является общим биологическим феноменом. Некоторые антибиотики, сильные бактериостатические агенты, не стали лекарственными препаратами ввиду их токсичности. Часто эти соединения оказывались высокоактивными в отношении тканей с быстрым делением клеток у млекопитающих (таких как гемопоэтические или лимфоидные, которые пролиферируют в ответ на антигенный стимул), а также были способны подавлять неопластическую пролиферацию.

К этим препаратам относятся актиномицины, получаемые из культур *Streptomyces antibioticus*. Актиномицин С применялся в клинических исследованиях как иммуносупрессивный препарат при трансплантации. Предполагается, что актиномицины избирательно образуют комплексы с ДНК, подавляя таким образом синтез РНК и белка. Аналогичным препаратом является митомицин С, полученный из *Streptomyces caespitosus*; он подавляет ДНК-зависимый синтез РНК. Этот препарат, также использовавшийся в клинике при злокачественных новообразованиях, блокирует функции Т-клеток в реакциях клеточно-опосредованного иммунитета. Обнаружено, что митомицин С усиливает резистентность в некоторых опухолевых моделях, причем эта устойчивость связана с проявлением «неспецифически» индуцированных Т-супрессорных клеток.

Хорошо известным антибиотиком, применяемым при инфекциях у людей, является хлорамфеникол. Препарат, первоначально выделенный из *Streptomyces venezuelae*, в настоящее время производится синтетически. Он останавливает синтез белка, блокируя присоединение РНК-матрицы к рибосомам. У экспериментальных животных хлорамфеникол (в достаточно высоких дозах) подавляет первичный гуморальный ответ. Кроме того, он блокирует вторичный ответ (даже при нормальном развитии первичного) и увеличивает время жизни кожного трансплантата.

Модификаторы биологического ответа

Национальный раковый институт (НРИ) США в 1978 г. ввел в употребление термин «модификаторы биологического ответа» (МБО). Эти

агенты определяются как вещества, способные изменять биологические реакции на опухолевые клетки, что обуславливает терапевтически благоприятный исход. Отдел по лечению рака НРИ разработал программу развития МБО.

К биологическим ответам, подлежащим модификации, относятся защитные реакции организма, которые могут быть изменены посредством усиления эффекторных механизмов или медиаторов. Ниже перечислены группы препаратов, которые включены в данную программу.

I. Препараты, повышающие противоопухолевый иммунитет, модулирующие компоненты иммунного ответа, индуцирующие или восстанавливающие эффекторы иммунитета.

II. Интерфероны и цитокины.

III. Тимические гормоны и факторы.

IV. Опухолеспецифические вакцины.

V. Иммунные эффекторы в виде клеток или антител.

В следующую группу МБО входят вещества, специфически влияющие на регуляцию иммунного ответа, особенно те, которые имеют отношение к супрессорным механизмам, действующим по типу обратной связи. Ряд препаратов в настоящее время находится в стадии исследований, проводящихся во всем мире с целью оценки способности тех или иных агентов усиливать иммунный ответ, причем многие из них относятся к антибиотикам, получаемым из *Streptomyces spp.*

Противоопухолевые препараты, усиливающие иммунный ответ

Адриамицин

Адриамицин (доксорубицин) является аминокликозидным антибиотиком, первоначально выделенным из грибов *Streptomyces peucetius var. caesius*. При исследовании реакций организма на опухоли обнаружено, что адриамицин (АМ) селективно модулирует иммунный ответ. В ранних исследованиях показано, что АМ имеет большую эффективность в моделях с антигенными опухолями по сравнению с неантигенными моделями у мышей, а лечение антибиотиком приводит к значительному повышению клеточно-опосредованных цитотоксических ответов, что связано с усилением активности Т-клеток и макрофагов. В то же время выявлено подавление антителообразования и естественных клеток-киллеров (ЕКК).

Цитолитический ответ не развивается при удалении Thy 1,2 (с клетками), что указывает на участие Т-клеток в усилении ответа. Роль моноцитов и (или) макрофагов определяется в исследовании, в котором терапевтическая эффективность АМ снижается после введения кремния или каррагенана. Зрелые макрофаги относительно нечувствительны к АМ в отличие от незрелых моноцитов, количество которых избирательно увеличивается. Под действием АМ повышаются ПГЕЮ и интерлейкин-2. Пока неясно, является ли повышение ИЛ-2 первичным эффектом АМ или же оно связано с увеличением образования ИЛ-1 моноцитами и (или) макрофагами.

Блеомицин

Блеомицин, полученный из *Streptomyces verticillus*, является гликопептидным противоопухолевым веществом, эффективным при заболеваниях человека. По своему действию блеомицин отличается от других противоопухолевых антибиотиков. Так, при взаимодействии блеомицина с очищенной ДНК происходит выделение свободных оснований из ДНК; кроме того, препарат вызывает высвобождение нуклеосом из хроматина и хромосом. Действие блеомицина характеризуется невысокой костномозговой токсичностью или же ее отсутствием.

У морских свинок, получавших 125 мг/кг блеомицина через 2-3 дня после сенсибилизации, усиливается реакция повышенной чувствительности замедленного типа, особенно контактная чувствительность. Кроме того, у них после антигенной стимуляции усиливается пролиферация Т-клеток в дренирующих лимфатических узлах. Как и в случае с адриамицином, предполагается, что подобный эффект обусловлен повышенным образованием ИЛ-2, поскольку ИЛ-2 увеличивает пролиферацию только после связывания антигена или митогена с клеточной мембраной. Недавно было показано, что блеомицин активирует макрофаги, повышая их цитотоксичность в отношении опухолевых клеток.

Другие противоопухолевые антибиотики

В то время как адриамицин и блеомицин уже применяются в качестве противоопухолевых препаратов, существует ряд недавно полученных (в основном в Японии) антибиотиков, обнаруживающих интересные иммуномодули-

рующие свойства в опухолевых и неопухолевых моделях.

Спорамицин. Это вещество получено из фильтрата культуры *Streptosporangium pseudovulgare*. Антибиотик усиливает противоопухолевый иммунитет у мышей, активируя Т-клетки. Нейтрализующая активность Т-клеток уменьшается при обработке анти-Thy 1,2 антителами.

Макромицин. Это полипептид, выделенный из фильтратов культуры *Streptomyces maeromycetiaus*; он повышает резистентность мышей к опухоли, действуя на макрофаги и Т-клетки.

Аклациномицин А. Аклациномицин А является антрациклином, выделенным из фильтрата культуры *Streptomyces galilaeus*. Он предотвращает синтез РНК, подавляя РНК-полимеразу.

Показано, что препарат усиливает антителообразование и повышенную чувствительность замедленного типа. Антибиотик обладает высокой цитотоксичностью по отношению к лимфоцитам, индуцированным Кон-А, ФГА и Л ПС. Аклациномицин А избирательно угнетает образование супрессорных клеток при выработке антител и повышенной чувствительности замедленного типа.

Оксанозин. Оксанозин представляет собой нуклеозид, обнаруженный в фильтрате культуры *Streptomyces carneolus*. Это соединение обладает низкой токсичностью, а в дозах 25-400 мг/кг усиливает повышенную чувствительность замедленного типа к эритроцитам барана у мышей. Он также замедляет рост опухолевых клеток, одновременно подавляя супрессорную активность клеток. Данные экспериментов на клеточных популяциях селезенки предполагают, что под действием оксанозина эффекторные клетки, отличные от Т-клеток (возможно, макрофаги), активируются и становятся цитотоксичными.

Неотрамицин. Антибиотик выделен из фильтрата культуры *Streptomyces thiolutheus*. Он ковалентно связывается с пуриновыми основаниями ДНК, вызывая подавление синтеза ДНК в клетке. Неотрамицин не подавляет иммунного ответа; более того, он повышает образование IgM-антител и гиперсенситивность замедленного типа. Он также увеличивает образование перекисей макрофагами, которые стимулируются форбол-миристил-ацетатом. Кроме того, неотрамицин активирует цитотоксичность, опосредованную макрофага-

В настоящее время предполагается существование двух механизмов, посредством которых модификаторы биологического ответа могут усиливать иммунитет. Первый связан с угнетением образования супрессорных клеток, что приводит к повышению активности эффекторных Т-клеток.

Второй механизм обеспечивает увеличение продукции ИЛ-2, который эффективно усиливает пролиферацию Т-клеток-эффекторов. Данный механизм может быть связан как с прямым влиянием на образование ИЛ-2 лимфоцитами, так и с действием модификаторов на макрофаги, что обуславливает увеличение продукции ИЛ-1.

Адъюванты-это вещества, которые добавляются к вакцинам или антигенам, используемым при экспериментальной иммунизации, с целью усиления иммунного ответа. Они часто обозначаются термином «иммуностимуляторы». Данный термин имеет более широкое значение и относится к веществам, которые при введении сами вызывают состояние неспецифического иммунитета, характеризующегося повышенной резистентностью к инфекции или опухолевому росту. Многие вещества могут действовать и как адъюванты, и как иммуностимуляторы, поэтому различия между этими категориями являются скорее операционными, нежели принципиальными в отношении понимания их фармакологического действия. В этой главе основное внимание уделено стимуляции адъювантами специфического иммунного ответа.

Типы адъювантов

Многообразие веществ, действующих как адъюванты (от кремния до патоки), поражает. Адъюванты, используемые в экспериментальных исследованиях или приготовлении вакцин, могут быть разделены на четыре категории.

Неорганические гели

В 1926 г. Glenny, выделяя дифтерийный анатоксин, смешивал его с квасцами [$KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$], в результате чего образовывались преципитаты, которые оказались более иммуногенными, чем растворимый анатоксин. Вакцины, преципитированные квасцами, стали широко использоваться для иммунизации человека и животных. Для замены квасцов анатоксины иногда смешивают с преформированным гелем $Al(OH)_3$ или $AlPO_4$, с которым анатоксины связываются посредством ионов, образуя абсорбированные вакцины. В настоящее время соли алюминия или кальция остаются единственными адъювантами, приемлемыми для приготовления человеческих вакцин.

Эмульсия типа «вода в масле»

Этот тип адъюванта был разработан Фрейндом в 40-х годах нашего века. Водный раствор антигена эмульгируется в очищенном минеральном масле с помощью эмульгатора для образования водно-масляной эмульсии. Таким образом, антиген физически включается в капельки воды в масляной фазе. Масляные эмульсии используются в ветеринарных вакцинах; от их применения у людей в настоящее время отказались, поскольку у небольшого числа реципиентов в местах инъекций образуются стерильные абсцессы.

Масляную эмульсию адъюванта иногда называют неполным адъювантом Фрейнда в отличие от полного адъюванта Фрейнда, который содержит убитые микобактерии, суспензированные в масле. Полный адъювант Фрейнда обладает воспалительными свойствами, поэтому он неприменим даже для ветеринарных целей; однако при использовании для повышения титра антител у экспериментальных животных он наиболее эффективен.

Липофильные соединения

Широкий ряд липофильных соединений обладает адъювантной активностью. Сапонин, гемолитический и поверхностно-активный гликозид, экстрагированный из коры южноамериканского дерева *Quillaja saponaria*, используется в вакцинах при заболеваниях ног и полости рта, а также как пенообразующий агент в безалкогольных напитках. Витамин А и алифатические амины являются другими представителями этого типа адъювантов.

Бактерии

Bordetella pertussis-микроорганизмы, вызывающие коклюш и обладающие выраженной адъювантной активностью. Одним из преимуществ тройной дифтерийно-коклюшно-столбнячной вакцины является стимуляция микроорганизмами *Bordetella* ответа антител к двум

бактериальным токсинам. Адьювантная активность *V. pertussis*, по крайней мере частично, связана с их эндотоксином, который сам является адьювантом.

Добавление убитых микобактерий к неполному адьюванту Фрейнда приводит к образованию уже упомянутого полного адьюванта Фрейнда. Последний, помимо мощного усиления ответа антител, селективно повышает гиперсенситивность замедленного типа по отношению к белковым антигенам у морских свинок. Эта реакция использовалась для разделения компонентов стенки микобактерий с целью определения тех из них, которые опосредуют стимуляцию повышенной чувствительности. Установлено, что минимальной структурой является участок полимерной пептидогликановой основы клеточной стенки, который представлен мономерной единицей, состоящей из сахара и трех аминокислот. Синтетический аналог этого участка-N-ацетил-мурамил-L-аланин-D-изоглутамин, или мурамиддипептид (МДП, рис. 120), обладает всеми свойствами полного адьюванта Фрейнда при условии его эмульгирования в минеральном масле. Однако наиболее важным представляется то, что он стимулирует ответ антител и в водном растворе без масла. МДП как растворимое химически определенное вещество с низкой молекулярной массой обладает огромными преимуществами перед другими агентами при исследовании фармакологического действия адьювантов.

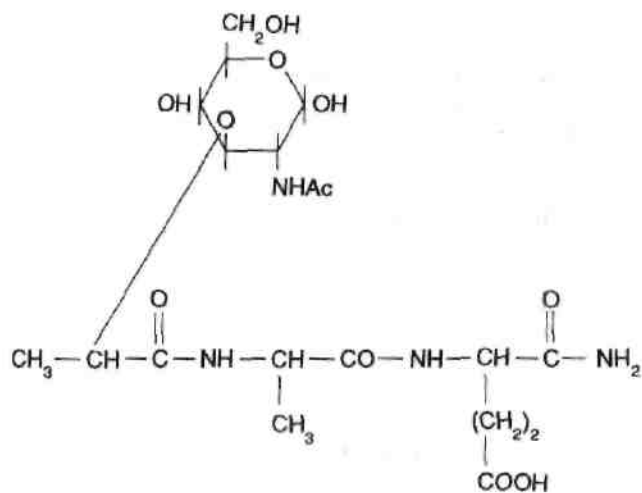


Рис. 120. Структура мурамиддипептида (МДП).

Механизм действия адьювантов

В понимании механизма действия адьювантов есть два сложных момента. Во-первых, многие адьюванты, такие как бактерии, сложны и гетерогенны по своему составу, поэтому не все из вызываемых ими многочисленных реакций в организме могут быть связаны с адьювантной активностью. Открытие химически определенных низкомолекулярных адьювантов типа МДП снимает это затруднение. Во-вторых, иммунный ответ представляет собой многостадийный процесс межклеточной кооперации, которые, несмотря на последние достижения в клеточной иммунологии, остается еще не вполне ясным. Это вносит определенные ограничения в понимание действия адьювантов на иммунную систему. Тем не менее существует ряд гипотез относительно механизма действия адьювантов, которые получили экспериментальное подтверждение и вполне применимы ко многим самым разным адьювантам.

Медленное высвобождение антигена

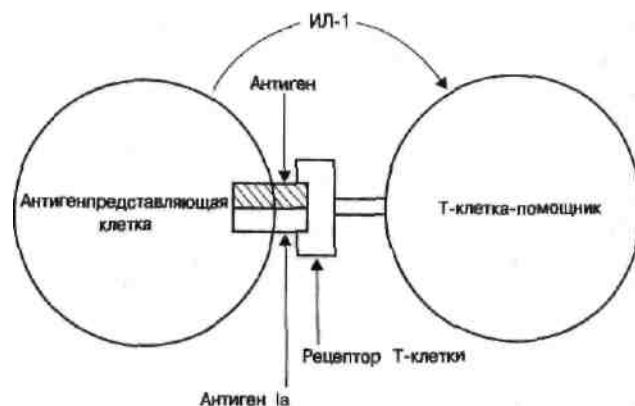
Антигены, адсорбированные на геле $Al(OH)_3$ или заключенные в водную фазу эмульсии типа масло в воде, могут медленно доставляться в иммунную систему, что имитирует множественные инъекции антигена и стимулирует реакцию антител вторичного типа. Хотя это объяснение представляется чисто механистическим, оно способствует пониманию активности вышеупомянутых адьювантов. Однако непонятно, как оно может быть применимо к низкомолекулярным веществам типа МДП.

Аккумуляция и активация макрофагов

Адьюванты, такие как $Al(OH)_3$ или адьювант Фрейнда, вызывают накопление мононуклеарных клеток, особенно макрофагов, в месте введения, что представляет собой гранулематозную реакцию. Макрофаги участвуют в первой стадии иммунного ответа в качестве так называемых антигенпредставляющих клеток (рис. 121). Белковые антигены, захваченные антигенпредставляющими клетками, расщепляются на пептидные фрагменты (для обозначения этого еще недостаточно понятого явления используется термин «процессинг»), которые затем экспрессируются на клеточной поверхности, где они физически связываются с антигенами гистосовместимости II класса

Рис. 121. Взаимодействие антигенпредставляющей клетки и Т-клетки-помощника.

Белковые антигены захватываются антигенпредставляющей клеткой (макрофагом) и разрушаются («процессируются») до пептидов, которые вместе с антигенами II класса комплекса гистосовместимости (антиген Ia у мышей) экспрессируются на клеточной мембране, где в виде комплекса распознаются рецепторами Т-клеток. Антигенпредставляющие клетки секретируют интерлейкин-1 (ИЛ-1), который стимулирует Т-клетки к продукции ростового фактора Т-клеток-интерлейкина-2 (ИЛ-2). Адьюванты стимулируют выделение ИЛ-1.



(Ia-антигены у мышей или антигены HLA-DR у человека). Т-клетки-хелперы могут распознавать только процессированные антигены, ассоциированные с антигенами гистосовместимости II класса, и неспособны распознавать свободный недеградированный белок. Макрофаги выделяют монокин, интерлейкин-1, который стимулирует Т-хелперы к секреции лимфокина-интерлейкина-2, ростового фактора Т-клеток. Следствием совместного действия ИЛ-1 и ИЛ-2 является клональная экспансия Т-клеток-хелперов (см. главу 14). Адьюванты связывают с началом цепи этих событий, так как все исследованные адьюванты (эндотоксин, МДП, $Al(OH)_3$) вызывают выделение ИЛ-1 макрофагами *in vitro*, хотя требуется подтверждение причинной роли данного процесса в адьювантном действии *in vivo*.

Влияние МДП на секрецию медиаторов макрофагами в настоящее время является областью исключительно активных исследований. Это связано с разнообразными фармакологическими эффектами МДП. Помимо адьювантного действия, он обладает пирогенным и сомногенным эффектами, включая индукцию медленноволнового сна. Синтезированы аналоги МДП, которые различаются по своим фармакологическим характеристикам. Так, два аналога (мурабутид, п-бутиловый эфир МДП, и треонил-МДП, в котором фе-нилаланин замещен треонином) сохраняют адьювантную активность, но больше не являются пирогенными. Совершенно очевидно, что это имеет жизненно важное значение для будущего клинического применения подобных соединений. Вместе с тем это ставит вопрос о специфичности их действия на макрофаги, поскольку предполагается, что ИЛ-1 идентичен

медиатору пирогенности, эндогенному пирогену. В настоящее время известно, однако, что ИЛ-1 является представителем семейства белков, причем гены для двух из них клонированы и определена их нуклеотидная последовательность. Предполагается, что избирательные фармакологические эффекты производных МДП вполне объяснимы в свете селективной стимуляции секреции разных типов ИЛ-1 и, возможно, других медиаторов.

Поскольку ИЛ-1 и ИЛ-2, как уже упоминалось, участвуют в запуске и росте Т-хелперных клеток, то справедлив вопрос: не обладают ли они сами свойствами адьювантов. Пока слишком рано давать ответ в отношении всего семейства ИЛ-1, так как эти вещества только сейчас становятся доступными в чистой форме в качестве белков, полученных методами генной инженерии. Кроме того, следует отметить, что они могут принимать участие в этиологии ревматоидного артрита (см. главу 14). Как показывает ряд работ, выполненных с ИЛ-2, проблемой здесь является его очень короткий период полураспада в плазме. Однако в некоторых исследованиях обнаружено адьювантное действие, например, преодолевающее генетическую нереактивность по отношению к антигену в адьюванте Фрейнда при введении ИЛ-2. Можно надеяться на открытие в будущем иммуностимулирующих препаратов, действующих как агонисты ИЛ-1 и ИЛ-2, или, напротив, иммуносупрессивных препаратов, действующих как их антагонисты.

Действие адьювантов на В-лимфоциты

Клональная экспансия Т-клеток-хелперов сменяется их взаимодействием с В-клетками, ко-

торые в свою очередь секретируют антитела. Как Т-, так и В-клетки являются возможными мишенями для действия адъювантов, хотя в настоящее время имеется немало доказательств в пользу предположения о макрофагах как о мишенях для большинства адъювантов. Однако обнаружено, что некоторые адъюванты действуют как заместители Т-клеток, т. е. они делают В-клетки способными к ответу на антиген и в отсутствие Т-клеток. Среди таких адъювантов особенно хорошо известен эндотоксин, являющийся митогеном В-клеток, а также недавно полученные 8-замещенные производные гуанозина, которые действуют таким же образом.

в свете современных иммунологических открытий, таких как роль ИЛ-1 и ИЛ-2 в запуске и росте Т-клеток.

Другими важнейшими участниками в разрабатываемых вакцинах вместо целых вирусов или бактерий являются очищенные белковые субъединицы, полученные методами генной инженерии, или даже синтетические пептиды. Вероятно, это расширяет область поиска новых иммунологических адъювантов для низкомолекулярных антигенов. Например, МДП является эффективным адъювантом для синтетических пептидов, особенно если они ковалентно связаны с МДП. Все это делает вполне возможным создание вакцин, в которых компоненты адъюванта и антигена будут полностью синтетическими и химически чистыми.

Заключение

С практической точки зрения область исследования адъювантов представляется достаточно статичной, поскольку неорганические гели $[Al(OH)_3]$, открытые в 20-х годах, остаются единственными адъювантами, используемыми в человеческих вакцинах. Данная глава должна показать, что основные достижения здесь будут получены в результате разработки низкомолекулярных соединений типа МДП, механизм действия которых может быть понят

29 Интерфероны

М. Мур, М. М. Даусон (M. Moore, M. M. Dawson)

Введение и терминология

Интерфероны (ИФН)-семейство индуцируемых секреторных белков, вырабатываемых клетками эукариотов в ответ на вирусы и другие стимулы. Термин «интерферон» был введен в 1957 г. Isaacs и Lindenman, которые показали, что среда культур аллантаической мембраны цыплят, зараженных вирусом гриппа, инактивированного прогреванием, может изменять способность к репликации другого вируса. С тех пор механизм противовирусного действия интенсивно изучается, и в настоящее время принято считать, что ИФН не обладают прямым противовирусным действием, а действуют профилактически, индуцируя противовирусные белки, которые защищают клетки от вирусных инфекций, подавляя трансляцию и транскрипцию, вызываемую вирусом.

Через 8 лет после открытия интерферона Wheelock описал противовирусное вещество в супернатантах культур человеческих лейкоцитов, стимулированных фитогемагглютинином. Это вещество, первоначально названное «иммунным ИФН», обладает биологическими и физико-химическими свойствами, присущими «классическому» ИФН, хотя последний лабилен при pH < 2 или > 10 и при нагревании (70 °C в течение часа).

Вскоре после его открытия в качестве противовирусного агента было обнаружено, что ИФН обладают множеством эффектов в отношении других клеток (табл. 36). Например, они являются мощными ингибиторами клеточной пролиферации и сильными иммуномодуляторами, активность которых включает влияние на антителообразование, на естественную цитотоксичность и экспрессию антигенов клеточной поверхности. Таким образом, хотя, по официальному определению, ИФН является белком, «проявляющим неспецифическую противовирусную активность в отношении гомологичных клеток посредством клеточных обменных процессов, вовлекающих синтез РНК и белка» (Номенклатура интерферонов, 1980), это семейство молекул, осо-

бенно иммунный ИФН, возможно, в большей степени относится к цитокинам с плейотропным влиянием на клеточную активность. Предполагается, что противовирусный эффект иммунного ИФН является полезным побочным действием в отношении других функций, контролируемых различной клеточной активностью.

Таблица 36. Биологические эффекты интерферонов

Эффекты интерферона	
подавление	усиление
Антивирусная активность (индукция противовирусного состояния клеток, обработанных ИФН)	Фагоцитарная активность (макрофагов)
Рост Бактерии (<i>Shigella flexneri</i>) Хламидии (<i>C. psittacosis</i> , <i>C. trachomatis</i>) Протозоа (<i>Plasmodium berghei</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>) Риккетсии (<i>R. akaii</i>)	Цитотоксичность (естественных клеток-киллеров и сенсibilизированных лимфоцитов)
Продифференциация клеток (нормальных, неопластических, фетальных)	Примирование (ускорение и увеличение продукции ИФН)
Дифференциация клеток	Экспрессия антигенов клеточной поверхности (включая антигены гистосовместимости)
Противоопухолевая активность	Адгезивность клеток (повышение тубулина)
Подвижность клеток в культуре	Повышение простагландина E (через циклооксигеназу)
Синтез ДНК и белка (индуцированного и неиндуцированного)	Повышение возбудимости (нейронов в культуре)
Снижение чувствительности мишеней (к действию ЕКК)	
Иммуносупрессия (антителообразование, повышенная чувствительность замедленного типа, реакция «трансплантат против хозяина», фиксация комплемента, гетерологичная адаптивная кожная анафилаксия)	

Клеточные источники и индукторы

Недавно интерфероны были разделены на три основных семейства: α , β и γ . Хотя классификация интерферонов первоначально была основана на антигенных различиях, определяемых нейтрализующими гетерологическими антисыворотками, а позже и моноклональными антителами, в последнее время она была подтверждена исследованиями аминокислотной последовательности. Они показали, что, несмотря на отчетливые различия этих трех классов, ИФН- α и ИФН- β в эволюционном плане более близки друг к другу, чем к ИФН- γ . Эта гипотеза подтверждается исследованиями генов ИФН при их клонировании. Хотя любая клетка, вероятно, способна к их образованию, ИФН- α и ИФН- β являются доминирующими формами интерферона (образуемыми лейкоцитами и фибробластами соответственно) после индукции вирусами и другими агентами (см. ниже). Перечень индукторов ИФН дан в табл. 37. Вирусы и dsРНК являются сильными индукторами *in vivo* и *in vitro*; наиболее мощным индуктором представляются РНК-вирусы миксо- и парамиксовирусных групп. Данные ряда исследований указывают на то, что dsРНК может быть проксимальным индуктором, по крайней мере ИФН- α и ИФН- β , даже

если они только временно продуцируются в течение репликативного цикла ДНК- и РНК-вирусов. В общем случае ИФН продуцируются при единичной экспозиции с индуктором *in vivo* и *in vitro*. Их действие специфично (хотя и не абсолютно) для всех видов. ИФН- γ , имеющий наибольшую видовую специфичность (из трех ИФН), обладает и межвидовой гомологией в аминокислотной последовательности. Уровень индукции может также зависеть от эффективности генов ИФН после индукции; так, у мышей существует несколько интерфероновых генов, контролирующих уровень продукции ИФН.

Иммунный ИФН (ИФН- γ) является доминирующей формой, образуемой Т-лимфоцитами, стимулированными специфическими антигенами, митогенами (ФГА, Кон-А) или аллоантигенами в реакции смешанных лимфоцитов. Стафилококковый энтеротоксин А и другие бактериальные продукты *Streptococcus pyogenes* также являются сильными индукторами. Наиболее вероятным продуцентом ИФН представляется Т-клетка-помощник, хотя группа цитотоксических/супрессорных Т-клеток, а также В-лимфоциты могут образовывать ИФН- γ *in vivo* при соответствующих условиях. Макрофаги необходимы в качестве дополнительных клеток, а интерлейкин-1 способен их замещать. Естественные киллерные клетки также являются продуцентами ИФН, особенно при их стимуляции интерлейкином-2 или инкубации с определенными линиями опухолевых клеток. Весьма необычной представляется продукция ИФН- α ЕКК при стимуляции опухолевыми клетками, поскольку данный ИФН продуцируется только в ответ на вирусы, dsРНК и некоторые микроорганизмы. Напротив, интерлейкин-2 индуцирует преимущественно ИФН- γ . Образование ИФН Т-лимфоцитами и ЕКК обсуждается ниже.

Таблица 37. Индукторы интерферона

ИФН- α/β	ИФН- γ
<p>Сильные индукторы ДНК- и РНК-вирусы (в том числе животные и растительные вирусы, а также бактериофаги) DsРНК нормальных клеток Синтетические dsРНК Синтетические ds-полинуклеотиды (поли-1: поли-С) и их комплексы с поли-L-лизинном (поли-ICLC) Слабые индукторы Бактерии Риккетсии Микоплазмы Хламидии Протозоа Микробные продукты (например, эндотоксин) Химические полимеры (такие как поликарбоновые кислоты, полисульфаты, полифосфаты)</p>	<p>Митогены Фитогемагглютинин Конканавалин А Митоген лаконоса Стафилококковый энтеротоксин А Антигены Очищенное белковое производное (ППД) Столбнячный анатоксин Дифтерийный анатоксин Вакцины Простой герпес Реакции смешанных лимфоцитов <i>Corynebacterium parvum</i></p>

Молекулярные и генетические характеристики

Человеческий ИФН- α первоначально тщательно приготавливался из лейкоцитов, зараженных вирусом, клеток, сенсibilизированных буфером, или инфицированных лимфобластоидных линий. Нередко препараты имели невысокое содержание ИФН и низкую специфическую активность; однако новая технология получения рекомбинантной ДНК оказала революционизирующее влияние на получение

ИФН, так что ИФН-а, а также ИФН других классов стали доступными в виде чистых препаратов, имеющих высокую специфическую активность и не загрязненных другими цитокинами. Это достигается экстрагированием информационной РНК из индуцированных клеток и созданием кДНК с помощью обратной транскриптазы. ДНК-копия встраивается в бактериальные плазмиды с целью образования множественных кДНК, которые исследуются на способность к поддержанию продукции антивирусной активности в супернатанте бесклеточных систем белкового синтеза. Позитивные бактериальные клоны могут быть пригодными для получения больших количеств чистого ИФН. Гены, кодирующие человеческие интерфероны *α* и *β*, располагаются на коротком плече 9-й хромосомы. Определены по крайней мере 13 ИФН-генов, они кодируют разные подтипы и неаллельны. Кроме того, существует 6 псевдогенов, для которых не найдено функциональных белков. Для ИФН-Р выявлен пока только один ген. Гены ИФН-а обладают примерно 90% гомологией нуклеотидной последовательности и необычны тем, что у них отсутствуют интроны.

Первичным продуктом трансляции информационной РНК ИФН-а является полипептид, содержащий 188-189 аминокислот, из которых первые 23 составляют гидрофобный сигнальный полипептид (обычное свойство секреторных белков), который отщепляется при транспорте из клетки. Зрелый ИФН-а, таким образом, состоит из 165-166 аминокислот, причем последние 10, вероятно, несущественны для биологической активности (рис. 122). Зрелый ИФН-а не гликозилирован.

Ген ИФН-Р также расположен на 9-й хромосоме и не содержит интронов. Большая структура ИФН-Р имеет сходство с ИФН-а. ИФН-Р представляет собой белок, содержащий 187 аминокислот с сигнальным пептидом (из 21 аминокислоты). ИФН-Р имеет единственно возможное место для N-гликозилирования; он более гидрофобен, чем ИФН-а. ИФН-а и ИФН-р обладают примерно равной 29% гомологией последовательностей, но она гораздо выше в двух высококонсервативных доменах между аминокислотами 28-40 и 120-150 (см. рис. 122).

Второй высококонсервативный домен может участвовать в связывании с клеточными рецепторами, поскольку он обладает некоторой гомологией с Р-субъединицей холерного

токсина, который конкурирует с ИФН за место связывания на мембране клеток-мишеней.

Ген для ИФН-у расположен на 12-й хромосоме и в отличие от генов ИФН-а/Р имеет три интрона и очень большие фланкирующие области (ПО и 587 нуклеотидов в областях 5' и 3' соответственно). Активный белок представляет собой 166-аминокислотный полипептид с сигнальным пептидом, состоящим из 20 аминокислот. Зрелый белок содержит избыток основных аминокислотных остатков и лабилен к изменениям температуры и в кислой среде. Существуют две формы человеческого ИФН-у: 20000 и 25000 дальтон; это белки, образующиеся при посттрансляционном процессинге первичного продукта (17 000 дальтон), что связано с разной степенью гликозилирования двух потенциальных мест.

Технология рекомбинантной ДНК также использовалась при изучении природы активных центров молекул интерферонов. Например, синтетические гены ИФН были созданы для образования ИФН с простыми аминокислотными заменами, которые помогли найти места, необходимые для активности, такие как уникальный триптофановый и метиониновый остатки в 48-й позиции ИФН-у. Гликозилирование интерферонов, вероятно, не является необходимым (хотя оно может определять тканевую специфичность), так как ни природный ИФН-а, ни генно-инженерные ИФН (всех трех классов), образуемые бактериями, не гликозилируются, сохраняя при этом, однако, свою биологическую активность.

В настоящее время нет сомнений в том, что ИФН взаимодействуют с рецепторами клеточной поверхности, что является первым необходимым этапом в развитии антивирусной защиты и экспрессии какой-либо другой активности, индуцируемой ИФН. (В этом отношении ИФН весьма напоминают гормоны). Ген, кодирующий рецептор для ИФН-а/р, располагается на длинном плече 21-й хромосомы. В течение ряда лет было известно, что клетки с трисомией 21-й хромосомы *in vitro* связывают большее количество ИФН (этот факт был использован при разработке высокочувствительного метода определения ИФН). ИФН-а/Р, вероятно, используют один и тот же клеточный рецептор в отличие от ИФН-у, располагающего уникальным рецептором. Как правило, при активации ИФН-генов активируются и гены для их рецепторов, хотя обработка клеток ИФН-у может вызвать обратную регуляцию рецепторов для ИФН-а/р. Поверх-

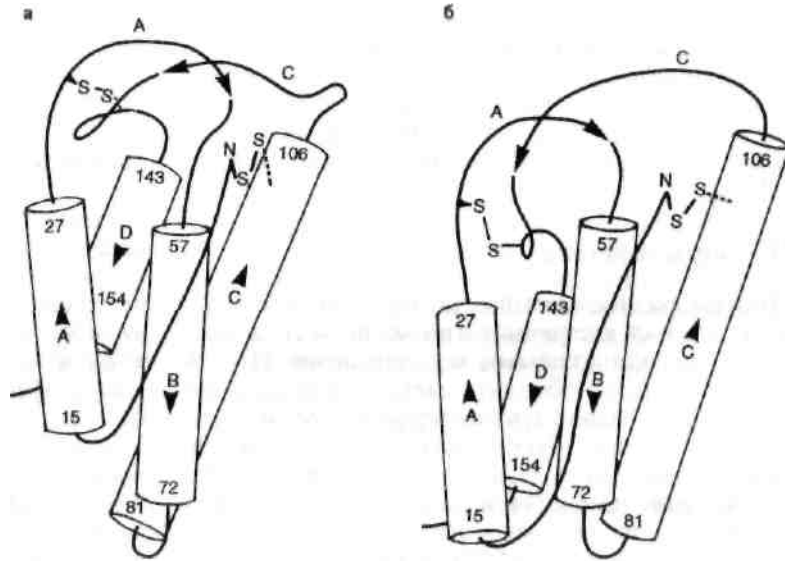


Рис. 122. Две возможные структуры интерферона (а и б).

Четыре α -петли (цилиндры) собраны в правосторонний пучок. Концы петель пронумерованы согласно аминокислотной последовательности ИФН-Р; указаны дисульфидные мостики ИФН-а, и возможные области Р-цепи (верхние стрелки). Черные короткие стрелки указывают возможные положения N-проксимальных (А) и С-проксимальных (С) идиотопов ИФН [Weissmann et al. ~ Phil. Trans. R. Soc. Lond., 1982, В 299, 7-28; с разрешения автора и Королевского Общества].

ность фибробластов человека содержит примерно 2400 высокоаффинных мест связывания для ИФН-у и гораздо меньше для ИФН-а/Р (< 1000). Для рецепторов ИФН-у определена константа связывания, равная $1-5 \cdot 10^{-8}$ М.

Молекулярная биология индукции

При любых исследованиях ИФН необходимо учитывать механизмы их индукции, как и механизмы их действия на клеточном уровне.

При индукции интерферонов активируются ИФН-гены, а также гены, кодирующие белки, которые участвуют в транскрипции и трансляции ИФН-генов. Как отмечалось выше, проксимальным индуктором ИФН-а/р является dsРНК; тип зараженных клеток может определять, какой ИФН-ген будет активироваться. Однако в некоторых клетках ИФН-гены экспрессируются координированно (например, в человеческой лимфобластоидной линии Namalva, индуцированной вирусом Sendai). Для индукции клеток требуется небольшое количество вирусных частиц, а уровень индукции зависит от физиологического состояния клетки. Так, неделящиеся клетки продуцируют гораздо больше ИФН. Действительный механизм активации ИФН-генов неясен, но транскрипция, по крайней мере ИФН-р, в человеческих фибробластах, стимулированных поли-*rI-rC*, не требует синтеза *de novo* регуляторного белка для активации гена, так как

транскрипция происходит и в присутствии ингибиторов белкового синтеза (циклогексимида). Обработка клеток бутиратом натрия перед индукцией заметно усиливает синтез ИФН, вероятно, благодаря влиянию на транскрипцию.

Продукция ИФН фибробластами ограничена во времени: он синтезируется вскоре после индукции и синтез прекращается через несколько часов. Его прекращение связано с низким содержанием иРНК для ИФН, которая быстро деградирует в течение этого периода времени. Распад иРНК происходит даже тогда, когда ген находится в состоянии транскрипции и, вероятно, связан с синтезом *de novo*, регулирующего иРНК на посттранскрипционном уровне. Супериндукция ИФН-р может наблюдаться у фибробластов, обработанных циклогексимидом и актиномицином D, которые значительно повышают его уровень, что обусловлено увеличением времени полураспада иРНК в отсутствие регуляторного белка.

Недавно были проведены эксперименты, в которых гены человеческого интерферона вводились в гетерологические клетки млекопитающих. Эти эксперименты должны способствовать более глубокому пониманию природы индукции ИФН.

Механизм индукции ИФН-у на молекулярном уровне еще менее понятен. При первичной стимуляции *in vitro* в реакции смешанных лимфоцитов ИФН-у продуцируется как человеческими, так и мышинными клетками только

через несколько дней культивирования, хотя в культурах присутствуют клетки памяти, которые могут отвечать на антиген очень быстрой продукцией ИФН-у. Неясно также, есть ли сходство между механизмами индукции ИФН-у и ИФН-*α/β* разными продуктами dsРНК.

Механизм действия

Многообразное влияние, которое ИФН оказывают на ряд клеточных типов, не всегда опосредуется одинаковыми механизмами. Поэтому необходимо обсудить метаболическую активность, изменяемую интерфероном, и соотнести ее затем с различными эффектами, такими как противовирусная активность, регуляторное влияние на клетки и подавление клеточной пролиферации. Кроме того, более полное понимание действия ИФН на молекулярном уровне может облегчить дальнейшую оценку его терапевтической эффективности.

Во-первых, ИФН, индуцированный вирусом или каким-либо другим агентом, секретируется во внеклеточную жидкость, где он может влиять на окружающие клетки или даже на клетки-продуценты, связываясь с ИФН-рецепторами на клеточной поверхности. Степень взаимодействия интерферона и соответствующих рецепторов важна для определения его последующей активности и может отчасти объяснить разницу в активности, которая наблюдается в различных препаратах ИФН. Аналогично этому, чувствительность различных типов клеток к действию ИФН может отражать плотность рецепторов клеточной поверхности или аффинитет их связывания.

Вследствие связывания с клеточными рецепторами происходит активация ряда белков, из которых лучше всего охарактеризованы следующие:

1) протеинкиназа-фермент, который фосфорилирует иницирующий фактор синтеза белков eIF_2 эукариотов, вследствие чего подавляется белковый синтез;

2) 2'5'-олигоденилатсинтетаза, известная также как 2-5-А-синтетаза, представляет собой фермент, катализирующий синтез 2' 5'-олигоденилатных полимеров, которые активируют эндогенную эндонуклеазу, вызывающую деградацию иРНК и рРНК. Нуклеаза расщепляет в основном УА- и УУ-последовательности РНК.

Оба обменных процесса активируются в клетках, обработанных интерфероном любого

класса, и зависят от dsРНК, образуемых как промежуточные продукты репликации или во время транскрипции.

Противовирусная активность

In vitro интерферон может подавлять репликацию практически любого типа вирусов. Степень подавления зависит от ряда факторов, включая тип вируса, класс или подтип используемого интерферона, клетку-мишень и инфективную фазу вируса. Чувствительность вируса к интерферону, как правило, постоянна в данной вирусной группе (здесь, как и везде, существуют исключения: в группе вирусов герпеса чувствительность NSV-1 выше, чем NSV-2). Доказательства того, что выраженность противовирусного состояния зависит от типа клеток, были получены в эксперименте, где проводилось сравнение чувствительности вирусов, растущих на разных клеточных линиях. Например, вирус везикулярного стоматита гораздо более чувствителен к интерферону, чем бычий энтеровирус, если он растет на бычьих клетках, но менее чувствителен при росте на клетках свиньи. Роль интерферона в инфекциях *in vivo* обсуждается ниже.

Механизм действия

Интерферон подавляет ранние события репликационного цикла вирусов, такие как прикрепление, пенетрация и «раздевание».

Хотя все три типа интерферона вызывают одинаковые биохимические изменения, предполагается, что индукция антигенов клеточной поверхности, таких как молекулы I и II класса ГКГС (см. ниже), под действием ИФН-у (и в меньшей степени ИФН-*α/β*) может вызывать значительные изменения топографии мембраны, что приводит к нарушению прикрепления вирусов и их пенетрации. Интерферон сильно подавляет эндоцитоз, опосредованный рецепторами, но этот эффект не коррелирует с развитием противовирусного состояния. Раздетая ДНК SV40 подавляется в клетках, обработанных ИФН; рядом исследователей показаны ранние ингибиторные эффекты ИФН в отношении репликации ретровирусов, такие как синтез ДНК через обратную транскриптазу и суперспирализацию провирусной ДНК перед интеграцией с геномом хозяина.

Для большинства других вирусов получено мало свидетельств значительного нарушения

указанных ранних событий или первичной транскрипции при обработке **ИФН**.

Подавление трансляции

Как киназа, так и 2-5-А-синтетаза являются эффективными ингибиторами трансляции, однако значение этих двух ферментов не всегда достаточно определено. Оба фермента зависят от присутствия dsРНК, в то время как анти-вирусное состояние клетки может развиваться в присутствии только одного ИФН. Недавние эксперименты показали, что уровень киназы в клетках может значительно возрасти без всякого сопутствующего повышения анти-вирусного состояния. Более того, в некоторых клетках, зараженных вирусом и обработанных ИФН, подавление dsРНК-зависимой киназы может быть достигнуто без сопутствующего увеличения анти-вирусного состояния. В бесклеточных системах активация или подавление киназы связаны с концентрацией dsРНК (высокая концентрация подавляет); причем при низких концентрациях KCl и Mg^{2+} для активации фермента требуется еще более низкая ее концентрация. Таким образом, активация данного фермента может значительно изменяться в зависимости от количества dsРНК, продуцируемой вирусом, а также от внутриклеточной концентрации ионов. По-видимому, существует четкая корреляция между активацией синтетазы и анти-вирусным состоянием клетки. Наличие направляемого вирусом подавления 2-5-А-синтетазозависимой эндонуклеазы может объяснить тот факт, что у некоторых клеток с высоким базальным уровнем синтетазы поддерживается нормальная репликация вирусов.

Показано, что интерферон оказывает значительное влияние и на более поздние стадии репликации вирусов, которые нельзя объяснить подавлением синтеза белка. Оно может быть связано с влиянием либо на количество вирусов, выделяющихся с клеточной поверхности, либо на выделение потомков с уменьшенной инфективностью.

При окончательной оценке анти-вирусного действия интерферона необходимо учитывать и его иммуномодулирующие свойства.

Подавление пролиферации

В 60-х годах было установлено, что интерферон обладает сильным ингибиторным влия-

нием сначала на рост культур клеток, а затем и на трансплантируемые опухоли у животных; это вызвало повышенный интерес к таким веществам как к потенциальным противоопухолевым агентам. Однако только спустя два десятилетия, когда стали доступными чистые препараты ИФН, полученные при аффинной хроматографии «натурального» интерферона с использованием моноклональных анти-интерфероновых антител или с помощью технологии рекомбинантной ДНК, появилась возможность однозначно отнести это свойство именно к интерферону, а не какому-либо загрязняющему белку.

Показано, что интерфероны нарушают рост ряда опухолей животных *in vitro* и *in vivo*, а также вызывают реверсию некоторых трансформированных клеточных линий. Поиск корреляции эффектов *in vivo* и *in vitro* не всегда заканчивался успешно; здесь, однако, не следует забывать об определенном влиянии интерферона на клетки иммунной системы, которое может *in vivo* усиливать ингибирование клеточного роста. С тех пор как в 1972 г. в Швеции интерферон был впервые применен в противоопухолевой терапии, было выполнено несколько клинических исследовательских программ. Их главные результаты суммированы ниже.

Механизм действия

Интерфероны обладают скорее цитостатическим, нежели цитотоксическим действием. Показано, что их эффективные дозы находятся в диапазоне от 0,2 до 10000 МЕ/мл в зависимости от типа клеток. Известные эффекты интерферонов на клеточном уровне включают в себя подавление роста, а также общее увеличение ригидности клеточных мембран и повышение уровня тубулина. Значение повышения активности 2-5-А-синтетазы и протеин-киназы для подавления роста клеток пока неясно, так как оба фермента зависят от dsРНК и индуцируются в клеточных линиях, которые определенно резистентны к ростовым регуляторным эффектам интерферона. Недавние эксперименты с использованием клеточных макрофагальных линий показали роль циклической АМФ-зависимой киназы в ингибиторных (в отношении роста клеток) эффектах интерферона. Мутантные клетки с дефектной киназой нечувствительны ни к ингибиторному влиянию цАМФ на рост, ни к аналогичным эффектам интерферона. Эти данные не пред-

ставляются универсальными; цАМФ в некоторых случаях является настоящим митогеном. Согласно недавно выдвинутому предположению, другой фермент, орнитиндекарбоксилаза (ОДК), участвует в механизме, посредством которого ИФН угнетает пролиферацию клеток. ИФН менее эффективно подавляет рост клеток Swiss 3T3 при наличии нескольких митогенных факторов (таких как опухолевые промоторы, ростовые факторы), чем в присутствии только одного митогенного стимула. Хотя данные митогенные факторы связываются со специфическими рецепторами на клеточной поверхности, они могут использовать один общий путь, который и подавляется интерфероном. Известно, что фермент ОДК, катализирующий первую реакцию в синтезе полиаминов, имеет отношение к росту клеток. Он активируется во всех изученных пролиферирующих клетках и сильно подавляется в клетках, обработанных ИФН. Более того, абсолютный уровень ОДК в обработанных ИФН клетках при их интенсивной стимуляции гораздо выше, чем в клетках, также обработанных ИФН, но стимулированных только одним сигналом, что можно использовать для определения различных эффектов интерферона.

Влияние на клеточную регуляцию и дифференциацию

Кроме глубокого влияния на клеточный рост, ИФН обладает множеством эффектов в отношении дифференциации клеток, которые можно обобщить следующим образом: ИФН подавляет дифференциацию клеток и в то же время увеличивает экспрессию специализированных функций в уже дифференцированных клетках. Ясно, что по крайней мере часть подавления дифференциации клеток может быть отнесена на счет уже обсуждавшегося выше угнетения клеточного деления. Влияние ИФН на регуляцию и дифференциацию клеток будет рассматриваться позже с учетом его отношения к иммунной системе, однако следует помнить, что не все эффекты ИФН связаны с иммунной системой.

Интерфероны как иммуномодуляторы

Определенное влияние ИФН на иммунную систему было известно уже в течение ряда лет. Оно включает в себя способность ИФН на-

рушать экспрессию антигенов клеточной поверхности, изменять продукцию и секрецию внутриклеточных белков и усиливать или подавлять функциональную активность некоторых эффекторных клеток.

В последнее время внимание к иммуномодуляторным способностям ИФН было сосредоточено на ИФН-у, информация о котором быстро растет в связи с доступностью продукта рекомбинантной ДНК. ИФН-у, по определению, является лимфокином, частично продуцируемым Т-клетками при иммунном ответе на вирусные и невирусные антигены, поэтому в сравнении с ИФН-а/Р он представляется более естественным кандидатом на роль иммунорегуляторной молекулы.

Как уже отмечалось, ИФН-у обладает определенной активностью и функциями, общими с ИФН-а и ИФН-В, но вместе с тем он оказывает многообразное влияние на клетки иммунной системы, миеломоноцитарные клетки и на ряд клеток других типов. Хотя некоторые из наблюдаемых эффектов могут быть опосредованы всеми тремя типами ИФН, эффективные дозы ИФН-у на несколько порядков ниже, чем у ИФН-а/р. Установлено, что другие эффекты, вероятно, почти полностью опосредуются ИФН-у, что может свидетельствовать о его менее значительной антивирусной активности по сравнению с таковой ИФН-а/р.

ИФН-у необходимо рассматривать в общем каскаде лимфокинов, который сопровождает антигенную или митогенную стимуляцию Т-лимфоцитов. Как и другие лимфокины, ИФН-у продуцируется Т-клетками в зависимости от секреции антиген представляющими клетками интерлейкина-1 (см. главу 15) и интерлейкина-2, образуемого главным образом Т-клетками-помощниками. При первичной стимуляции, например, в культуре смешанных лимфоцитов ИФН-у определяется через несколько дней, однако вторичная стимуляция сопровождается быстрым ростом высоких титров ИФН. Необходимость ИФН-у, образуемого во время Т-клеточного ответа, для дифференциации или созревания антигенспецифических Т-клеток остается спорной. Продукция ИФН-у и генерирование цитолитических Т-клеток могут быть независимыми и взаимосопровождающими проявлениями одного и того же процесса. Важно помнить, что при эндогенном образовании ИФН-у в ответ на антигенную или митогенную стимуляцию, которое сопровождается секрецией других лимфокинов, взаимодействие различных ме-

диаторов, направленных на клетку-мишень, является особенно сложным процессом, ввиду чего необходимо учитывать возможность синергизма между ИФН и другими молекулами. Клеточное происхождение ИФН зависит от индуцирующего стимула. Хелперные/индукторные (Т_п) и цитотоксические/супрессорные (Т_{ц/с}) клетки могут продуцировать ИФН-у в ответ на митогены или антигены, хотя растворимые антигены, вероятно, стимулируют преимущественно его продукцию Т-лимфоцитами-помощниками. Антигенспецифические клоны Т-клеток могут быть индуцированы к секреции ИФН либо митогеном, либо специфическим антигеном; те же клоны способны продуцировать ИФН в ответ на вирусную инфекцию, что говорит о независимой регуляции ИФН-гена комплекса ген- **ИФН**.

Большие гранулярные лимфоциты (БГЛ) представляют собой другой подтип лимфоцитов, который продуцирует ИФН-у в ответ на ИЛ-2, что может быть важным усиливающим механизмом *in vivo*. В последние годы БГЛ привлекли к себе особое внимание в связи с их спонтанной цитолитической активностью против инфицированных вирусом и трансформированных клеток. Термин «большие гранулярные лимфоциты» в основном синонимичен наименованию «естественные клетки-киллеры»; БГЛ представляют собой гетерогенную популяцию, активность которой наиболее высока в периферической крови. Их природа и происхождение остаются предметом споров, но, как нам представляется, по крайней мере одна из их субпопуляций относится к Т-клеточной линии. Однако в отличие от Т-клеток БГЛ не обладают иммунной памятью, а их цитолитическая активность не ограничена молекулами главного комплекса гистосовместимости. Не определено и их биологическое значение. Предполагается, что БГЛ играют основную роль в отторжении гемопозитических трансплантатов и принимают (частично) участие в ограничении вирусной инфекции и, вероятно, гематогенного распространения опухолей. Возможно, что ИЛ-2, образуемый Т-клетками в ответ на антигенный стимул, способен рекрутировать ЕКК (составляющие примерно 10% циркулирующих лимфоцитов и поэтому численно превосходящие специфические антиген-реактивные Т-клетки) в ИФН-продуцирующую популяцию.

Образование ИФН-у ЕКК в ответ на ИЛ-2 сопровождается усилением цитотоксической активности. Этот эффект ИЛ-2 представляется не-

зависимым от влияния ИФН который может сам по себе стимулировать естественную цитотоксичность посредством механизма регуляторной обратной связи (хотя и не столь эффективно, как вирусиндуцированные ИФН-а и ИФН-В). Данная активность представляется одной из редких ситуаций, в которой ИФН-а/В эффективнее ИФН-у. ИФН-у также индуцируется, например, ФГА у клонируемых БГЛ, длительно поддерживаемых в культуре ИЛ-2.

Маркеры клеточной поверхности

Таким образом, ИФН играет, по-видимому, основную роль в адаптивных и неадаптивных иммунных реакциях. Свойства ИФН-у и (в меньшей степени) ИФН-а/В, которые связаны с их способностью модулировать иммунный ответ, включают возможность вызывать изменения клеточной поверхности и подавлять пролиферацию клеток. ИФН стимулирует появление новых маркеров клеточной поверхности или рецепторов, связанных с дифференциацией. Первое свойство может быть проиллюстрировано его влиянием на продукты главного комплекса гистосовместимости-систему HLA у человека, которая кодируется мультигенным комплексом, расположенным на коротком плече 6-й хромосомы. Продукты ГКГС представлены двумя главными классами (I, II) гликопротеинов клеточной поверхности, которые необходимы для осуществления различных иммунных функций (III класс продуктов ГКГС представляет некоторые компоненты комплемента). Молекулы I класса состоят из тяжелых (а) цепей с молекулярной массой 45 kD, которые нековалентно связаны с меньшей молекулой (12 kD) Р-микроглобулина, кодируемого генами вне области ГКГС. Молекулы I класса представлены практически на всех ядросодержащих клетках и действуют как ограничивающие элементы для цитотоксических Т-клеток. Тогда Т-клетки, цитотоксические для клеток, зараженных вирусом гриппа, должны убивать только те из них, которые обладают таким же гаплотипом I класса ГКГС, что и Т-клетки.

Молекулы II класса, будучи гетеродимерными комплексами клеточной поверхности, которые состоят из тяжелых (а) и легких (р) цепей, имеют более ограниченное распространение в тканях. В основном (но не исключительно) они принадлежат к клеткам иммунной системы и представлены тремя главными специфическими свойствами (обозначаемыми

DP, DQ, DR), закодированными сублокусами в области HLA-D. Эти молекулы также являются ограничивающими элементами для цитотоксических Т-клеток; но к наиболее важным их свойствам относится представление антигена, для которого обязательна их экспрессия. Все три типа ИФН усиливают экспрессию продуктов генов I класса, а ИФН- γ обладает наиболее заметным влиянием на индукцию продуктов II класса. К клеткам, способным под действием ИФН- γ усиливать или синтезировать *de novo* антигены II класса, относятся лимфоидные и миеломоноцитарные клетки, меланоциты, злокачественные клетки меланомы, а также значительный спектр других линий опухолевых клеток.

В клетках человека ИФН- γ быстро индуцирует иРНК продуктов II класса, причем для продуктов некоторых сублокусов (DR, DP) больше, чем для других (DQ). Количество иРНК после удаления ИФН быстро уменьшается, однако экспрессия антигенов продолжается несколько дней. Индукция продуктов II класса на макрофагах, клетках Лангерганса, эндотелиальных и, возможно, опухолевых клетках имеет иммунологическую значимость (см. ниже), которая соотносится с иммунорегуляторной ролью ИФН. Например, ИФН- γ поддерживает линии макрофагов, способных к представлению антигена, и эндотелиальные клетки, чувствительные к цитотоксическим эффектам цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к продуктам II класса.

Экспрессия Fc-рецепторов

Следующей важной иммунорегуляторной функцией ИФН- γ представляется индукция или усиление экспрессии высокоаффинного Fc-рецептора для мономерного IgG (FcRI) на миеломоноцитарных клетках, а также сопряженных с ним функций. На некоторых линиях миелоидных клеток 5-10-кратное увеличение рецепторов происходит после нескольких часов инкубации. Аналогичные эффекты наблюдаются на незрелых миелоидных клетках на разных стадиях дифференциации - от миелобластов до зрелых гранулоцитов. Последние не экспрессируют высокоаффинные Fc-рецепторы, но экспрессируют на поздней стадии дифференциации Fc-рецепторы промежуточной аффинности, которые связывают агрегированный, но не мономерный IgG. ИФН- γ индуцирует высокоаффинные места связывания на нейтрофилах, причем их плотность такая же, как

у FcRI, экспрессируемых на нормальных миелоидных клетках.

Одна из функций, связанных с индукцией ИФН- γ рецепторов на незрелых миелоидных клетках, относится к способности опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ). Для этой функции требуются не только Fc-рецепторы, но и активация цитолитического механизма. ИФН- γ усиливает способность зрелых гранулоцитов осуществлять АЗКЦ-реакцию. Он также активировывает их кислородный обмен и способность к выделению протеолитических ферментов, что указывает на генерализованную активацию этих терминально дифференцированных клеток.

Функции макрофагов

ИФН- γ оказывает определенное влияние на макрофаги. Например, он является одним из факторов активации макрофагов (ФАМ). Данное свойство присуще (не в явной форме) и ИФН- α/β . Так, ИФН- γ может индуцировать или повышать опухолюподобную активность моноцитов человека, как и их фагоцитарную активность. Он также вызывает активацию окислительного метаболизма и антипротозойных кислородных и неокислородных механизмов, например против *Toxoplasma gondii* и *Leishmania donovani*. ИФН- γ угнетает внутриклеточных паразитов в клетках немакрофагального происхождения. Предполагается, что эффект ФАМ обусловлен синергизмом действия ИФН и других факторов.

В-лимфоциты

Интерфероны оказывают либо усиливающее, либо подавляющее влияние на В-клеточные ответы (как *in vitro*, так и *in vivo*) в зависимости от времени экспозиции. При добавлении ИФН- γ *in vitro* на поздних стадиях иммунного ответа секреция Ig увеличивается. ИФН- γ может замещать другой лимфокин Т-клеток (фактор, замещающий Т-клетки), который, действуя в синергизме с другими хелперными факторами, стимулирует антительные ответы *in vitro*. Кроме того, ИФН- γ может действовать как фактор созревания В-клеток, прямо индуцируя фенотипические изменения и секрецию Ig в покоящихся В-лимфоцитах. Однако необходимо помнить, что ИФН- γ представляет собой один из двух (или более) факторов, способных индуцировать дифференциацию В-клеток.

В заключение можно отметить, что ИФН-у является важным фактором, выделяемым в каскаде лимфокинов, который обладает многогранным влиянием на клетки иммунной системы. ИФН играют важную роль не только в адаптивном иммунном ответе, они влияют на клетки, участвующие в неадаптивных реакциях организма, регулируя их пролиферацию, дифференциацию и эффекторные функции. Возможно, однако, что эффекты ИФН-у, по крайней мере некоторые из них, могут быть вторичными по отношению к действию лимфокина на рецепторы клеточной поверхности для других факторов или регуляторных молекул.

Интерферон и инфекционные заболевания

Роль эндогенного интерферона

Хотя ИФН являются сильными ингибиторами репликации вирусов в тканевых культурах, до сих пор неясно, насколько они необходимы для выздоровления при острых и хронических инфекциях у людей. Формальное доказательство может быть получено при введении анти-ИФН-антител добровольцам во время острой вирусной инфекции, однако подобная процедура не лишена риска. У человека осуществим другой подход, связанный с идентификацией заболеваний, сопровождающихся дефицитом продукции ИФН и изучением эффектов экзогенного ИФН или продукции (где возможно) эндогенного ИФН. Результаты исследований на животных (в которых возможна нейтрализация эндогенного ИФН) четко свидетельствуют в пользу предположения об ИФН как о критическом компоненте врожденного ответа на вирус.

Количественное определение ИФН может осуществляться несколькими методами: а) антивирусная активность измеряется в различных жидкостях организма, включая сыворотку, содержимое обычных вирусных экзантем, клеток и тканевых экстрактов; б) ИФН-индуцируемые ферменты могут определяться в сыворотке и мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК); в) МКПК могут быть заражены вирусом для определения их антивирусного статуса; г) МКПК могут обрабатываться стимуляторами продукции ИФН (например, поли- γ -поли- γ С, митогеном и т. д.) для определения индуцируемости ИФН в оп-

тимальных условиях *in vitro*; д) ИФН-ассоциированные функции, такие как усиление активности естественных киллерных клеток, могут быть использованы для непрямого измерения ИФН. Получение моноклональных антител к основным типам ИФН позволяет осуществлять радиоиммунологическое определение, которое во многих лабораториях часто заменяет или, во всяком случае, дополняет биологическую оценку.

Простейшая интерпретация факта подавления ИФН репликации вирусов *in vitro* заключается в том, что сходный механизм действует в месте инфекции *in vivo* до тех пор, пока не мобилизуются вирусоспецифические клеточно-опосредованные и гуморальные ответы. Однако не исключено, что ИФН имеет важное значение только как модулятор адаптивных и неадаптивных реакций организма. Более того, анализ влияния ИФН на системном уровне осложняется их способностью активизировать разнообразные патогенетические системы (такие как простагландиновая и кортикостероидная), а также многочисленные внутриклеточные обмены, оказывающие собственное влияние на иммунную систему. Тот факт, что ИФН могут индуцироваться *in vitro* рядом микроорганизмов, а также определяются *in vivo* при бактериальных и паразитарных инфекциях, указывает на его многогранную роль при инфекционных заболеваниях. Свидетельства нежелательных эффектов, вызываемых экзогенным ИФН у животных и человека, а также наличие ИФН при различных аутоиммунных заболеваниях говорят об их возможной роли в симптоматике и даже в патогенезе заболеваний.

Поскольку ИФН являются индуцируемыми белками, их уровни в норме крайне низки. Любой спонтанный ИФН, который образуется, например, в лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником и постоянно находящейся под воздействием антигенов, поступающих из желудочно-кишечного тракта, может участвовать в поддержании иммунологического гомеостаза.

Определен ряд заболеваний, при которых выявляется относительный или абсолютный дефицит продукции ИФН вследствие самой патологии или нарушения ответа на вирусную инфекцию. При немолниеносных вирусных заболеваниях ИФН определяется у 85% больных, причем у 70%-мононуклеарные клетки периферической крови резистентны к заражению вирусом везикулярного стоматита. У тя-

желых больных со скоротечным гепатитом ИФН в сыворотке не выявляется, а клетки крови чувствительны к заражению вирусом и неспособны к образованию ИФН *in vitro* в ответ на адекватные стимулы. Тем не менее неясно, насколько скоротечный характер данного заболевания обусловлен дефицитом продукции ИФН или является его следствием.

Установлена временная связь между действием эндогенного ИФН и выздоровлением. Исследование везикулярной жидкости при герпес *zoster* у нормальных лиц и индивидуумов с иммунодепрессией, у которых инфекция протекала в более тяжелой форме, способствовало новому пониманию проблемы. Жидкость пузырьков при опоясывающем или простом герпесе обычно имеет высокие титры ИФН, и, хотя свежие пузырьки продолжают появляться, поражения заживают очень быстро. У иммунодефицитных больных с различными опухолями, в частности с болезнью Ходжкина, пузырьки имеют тенденцию к слиянию и персистируют (не разрешаясь) в течение нескольких дней. Такие пузырьки не содержат определяемого ИФН; наблюдается также диссеминация вируса. Начало определения в пузырьках ИФН совпадает с появлением комплексообразующих антител к вирусу ветряной оспы и быстрым разрешением состояния. Неспособность к продуцированию ИФН сопровождается более генерализованным дефицитом защитных сил организма, который проявляется отсутствием иммунологического ответа на антигены вируса ветряной оспы. Эти наблюдения позволяют осуществлять более рациональное лечение опоясывающего герпеса у раковых больных, что было впоследствии подтверждено применением экзогенного ИФН.

Неспособность продуцировать ИФН изначально обусловлена самим организмом. Она наблюдается у больных со злокачественным заболеванием крови, с анемией, врожденным или ятрогенным иммунодефицитом, лепрой, туберкулезом, синдромом приобретенного иммунодефицита. Однако ряд вирусов (например, вирусы острого гепатита А и Б) *in vivo* относятся к неэффективным стимуляторам ответа, приводящего к появлению циркулирующего ИФН.

Образование ИФН *in vivo* не ограничивается острой вирусной инфекцией. Большое количество грамотрицательных и грамположительных бактерий, хламидий, кокциел, микоплазм и риккетсий индуцируют ИФН *in vitro*. Бактериальный эндотоксин и протозойные инвазии

индуцируют циркулирующий ИФН. ИФН в спинномозговой жидкости у больных бактериальным или асептическим менингитом и в ушных выделениях у детей с отитом обычно связан с бактериями вида *Haemophilus influenzae*. Степень участия ИФН в процессе выздоровления при бактериальных инфекциях недостаточно известна. Вероятно, повышение ИФН способствует усилению макрофагально-го и нейтрофильного фагоцитоза.

Имунопатологические эффекты интерферона

ИФН определяется в сыворотке у больных с аутоиммунным заболеванием, коллагенозом, например при системной красной волчанке, синдроме Behcet, также при СПИДе. Причина появления ИФН и их значение неизвестны, как и их роль в патогенезе заболеваний. Токсические эффекты ИФН впервые были показаны Gresser на мышах. У животных, которым с рождения ежедневно в течение более 7 дней вводили чистый ИФН, развивался скоротечный некроз печени. Если же ИФН вводили менее недели, то у животных прекращался рост и примерно в течение 3 нед развивался гломерулонефрит по типу заболевания с иммунными комплексами и поздними клиническими проявлениями.

Изменения в почках при лимфоцитарном хориоменингите у мышей не отличаются от изменений, вызванных ИФН. Предполагают, что такие поражения вызываются эндогенным ИФН, поскольку они соответствуют количеству и времени персистенции интерферона в крови и могут модулироваться анти-ИФН-сывороткой. Повторные инъекции ИФН ускоряют начало аутоиммунной гемолитической анемии у инбредных мышей, чувствительных к данному заболеванию, что представляет интерес в свете предполагаемого патогенеза аутоиммунных состояний у человека.

Введение людям чистого интерферона различными способами в дозах ($> 10^8$ МЕ), сопоставимых с уровнями циркулирующего и местного ИФН, которые определяются при вирусных инфекциях, приводит к аналогичным осложнениям, что в настоящее время очень четко задокументировано. Дозозависимая лихорадка с симптомами гриппа является основной реакцией, а повторные инъекции связывают с возникновением переутомления, ано-рекции, общего недомогания, хронических головных болей и ортостатической гипотонии. Судя по времени появления этих реакций (воз-

никающих через несколько часов после в/м или в/к введения или через 30-60 мин после в/в инъекции), воспалительным медиатором здесь должен быть не сам ИФН, а другие факторы. Данное предположение подтверждается тем фактом, что наблюдаемые симптомы и фебрильные реакции могут быть смягчены подавлением синтеза простагландинов с помощью ингибитора циклооксигеназы индометацина, тогда как другие метаболические события (гидрокортикостероидный ответ и изменение уровня циркулирующих микроэлементов) остаются без изменений. Неизвестно, на каком уровне ИФН стимулирует образование кортикостероидов на уровне надпочечников, гипофиза или гипоталамуса. Интересно, что кортико-стероиды и стресс подавляют продукцию ИФН и изменяют его противовирусное действие. ИФН стимулирует также IgE-опосредованную дегрануляцию сенсибилизированных тучных клеток, однако неизвестно, имеет ли это какое-либо отношение к обычной вирусной инфекции, часто сопровождающейся обострением астмы или астматическим бронхитом. Иногда повторные инъекции ИФН вызывают аллергические реакции в виде местной замедленной гиперсенсибилизации, генерализованной крапивницы или неспецифической эритематозной сыпи, однако не исключено, что они связаны с определенным (небольшим) аллергогенным загрязнением препаратов.

Более выраженные токсические побочные эффекты наблюдаются в случае введения ИФН в дозах, значительно превышающих уровень эндогенного ИФН, индуцируемого большинством вирусов при внутривенной инфузии в течение нескольких недель (что предусматривается многими схемами лечения опухолей). ИФН вызывает сильное недомогание с признаками нарушения центральной нервной системы (спутанность сознания, ступор или кома), а также чрезмерные медленноволновые аномалии на электроэнцефалограмме. Кроме того, могут наблюдаться выраженные метаболические нарушения в виде гиперкалиемии, иногда гипокальциемии, гиперкальциемии и небольшого повышения уровней мочевины и креатинина.

К другим эффектам высоких доз интерферона относятся нарушения сердечного ритма, причем отмечено несколько внезапных смертельных исходов, в частности, у больных с заболеванием сердца в анамнезе. Умеренные или высокие дозы интерферона вызывают подъем уровня печеночных ферментов - аспар-

таттрансаминазы, α -глутамилтранспептидазы и щелочной фосфатазы. У детей, леченных интерфероном в связи с врожденной цитомегаловирусной инфекцией, а также у взрослых при повторном получении доз препарата может наблюдаться снижение массы тела, отчасти вследствие потери аппетита. О прямом подавлении клеточного роста свидетельствует и алоpecia, возникающая у взрослых при лечении интерфероном. Дозы интерферона, недостаточные даже для индукции лихорадки (т.е. $< 10^6$ МЕ), неизбежно вызывают лимфоцитоз и преходящий нейтрофильный лейкоцитоз. С другой стороны, более высокие дозы и длительное лечение вызывают обратимую супрессию всех элементов костного мозга. При прерывании или изменении дозового режима, предусмотренного схемой клинического лечения, часто наблюдаются гранулоцитопения и тромбоцитопения, особенно если костный мозг уже мог быть поврежден (например, при хронической цитомегаловирусной инфекции) или если ранее назначались угнетающие костный мозг препараты.

Доказательства опосредования эндогенным интерфероном каких-либо патогенетических изменений, наблюдаемых при вирусных инфекциях у людей, весьма приблизительны. В этом случае следует допустить, что ситуация не является многофакторной с участием ряда химических веществ (интерлейкины, простагландины, лейкотриены, гистамин, 5-окситриптами), образующихся в ответ на многие лимфокины и цитокины.

Данных относительно использования интерферона в качестве противоиногозного средства (за исключением лечения вирусных инфекций) пока еще очень мало. Поскольку при острой вирусной инфекции интерферон продуцируется обычно очень рано, введение экзогенного интерферона в период появления симптоматики заболевания, как правило, не влияет на быстрое разрешение большинства инфекций. Следует также учесть, что часть наблюдаемых симптомов вызывается эндогенным интерфероном. Следовательно, для обеспечения эффективности интерферона необходимо либо его профилактическое назначение, либо его введение при острых инфекциях, длительное течение которых связано с недостаточной продукцией эндогенного интерферона. Одно из наиболее ярких вторичных наблюдений отмечено при клиническом исследовании интерферона, когда было выявлено снижение инфекций невирусной природы у больных с

трансплантацией почек. Речь здесь может идти о прямом действии интерферона, заключающемся в подавлении репликации, повышении макрофагальной активности и других иммунологических функций или же о предупреждении экспрессии иммунодепрессивных вирусов, таких как цитомегаловирус.

Эффекты интерферона усиливаются химическими противовирусными агентами, используемыми при лечении простого герпеса глаз и, возможно, при хроническом активном гепатите.

Применение экзогенного интерферона при лечении вирусных инфекций

Действие экзогенного интерферона было исследовано при ряде вирусных заболеваний. Простуда поддается лечению интерфероном при условии его интраназального введения в достаточной высокой дозе (3×10^6 МЕ) и при отсутствии длительного промежутка времени между введением препарата и заражением вирусом. На практике указанную дозу интерферона необходимо давать 3 раза в день для надежной защиты добровольцев от заражения риновирусом в любое время суток. Аналогичные дозы, как было показано, эффективны при заражении коронавирусами и вирусом гриппа А.

Необходимость назначения столь высоких доз для эффективной профилактики заражения обусловлена двумя причинами. Первая связана с фармакокинетической проблемой, а именно: при интраназальном введении вещества очень быстро выводятся из полости носа; вторая связана с инактивацией человеческого интерферона секретами носа. В настоящее время интраназальные препараты с высоким титром, которые назначаются нечасто в виде однократно используемых аэрозолей, проходят разнонаправленные испытания с целью изучения возможностей интерферона в профилактике простуды.

К сожалению, необходимая для защиты от простуды доза интерферона вызывает местное воспаление, дискомфорт и кровотечение через 1-2 нед регулярного применения. Эти осложнения не связаны с типом интерферона, так что вряд ли данный препарат (в виде монотерапии) будет широко использоваться для профилактики простуды или даже гриппа, несмотря на его высокую эффективность. ИФН ограниченно используется с профилактической целью в течение короткого периода времени после

контакта с больными, страдающими простудным заболеванием.

Следует отметить, что большинство клинических исследований ИФН, проведенных при лечении различных вирусных заболеваний, были неконтролируемыми и не дали однозначного результата. Существует возможность защиты от цитомегаловирусного синдрома больных с трансплантированной почкой, однако небольшое повышение доз приводит к интоксикации и чревато отторжением трансплантата. Таким образом, практически во всех случаях рациональность использования ИФН определяется конкретной клинической ситуацией. Исключения составляют применение глазных интерфероновых капель при герпетическом кератите, а также местное лечение бородавок. Процесс заживления герпетических язв ускоряется при комбинации интерферона с трифтортимидином или ацикловиром. При других заболеваниях, таких как хронический гепатит В, пока неясно, обусловлено ли клиническое улучшение, наблюдаемое у небольшой части больных (а также установленное по данным биопсии печени), лечением ИФН или же оно происходит спонтанно. Эта неясность частично связана с непредсказуемостью естественного течения заболевания.

В заключение можно отметить, что **ИФН** продуцируется при многих острых вирусных заболеваниях и, вероятно, играет важную роль в быстром разрешении подавляющего большинства заболеваний, наблюдаемых у человека. Идентификация клинических ситуаций, при которых интерферон не образуется и поэтому вирусные заболевания протекают более тяжело и продолжительно, вполне возможна. Однако это не означает возможности точного определения причины и следствия. Образование ИФН не ограничено вирусными заболеваниями, поэтому широкий спектр его иммунных функций может быть не менее важным, чем противовирусное действие при выздоровлении. Кроме того, определенное значение для регуляции иммунного ответа может иметь постоянная или периодическая продукция ИФН на низком уровне в лимфоидной ткани. С другой стороны, **ИФН** обладают весьма травмирующим токсическим действием у человека. ИФН могут не быть единственным или главным медиатором воспаления и лихорадки при вирусных заболеваниях, но они, безусловно, претендуют на центральную роль. Вероятно, **ИФН** стимулируют образование эндогенного пирогена (интерлейкина-1), кото-

рый вызывает выделение медиаторов воспаления.

Изначально заявленный как «пенициллин» широкого спектра действия для лечения вирусных инфекций, ИФН, вероятно, имеет значение лишь в некоторых ограниченных клинических ситуациях. Его наиболее ценные качества могут проявиться при дефиците эндогенного интерферона и в случае использования при профилактике инфекции.

Применение интерферона при злокачественных новообразованиях

По механизму своего действия ИФН существенно отличаются от препаратов, обычно используемых при химиотерапии злокачественных опухолей (алкилирующие агенты, анти-метаболиты и др.), и могут служить прототипом модификаторов биологических реакций. Хотя первые исследования ИФН при злокачественных новообразованиях были предприняты в связи с ошибочным представлением об эндогенных вирусах как о причинном факторе некоторых опухолей, вскоре были получены различные доказательства его благотворного действия на раковых больных, что свидетельствовало о возможности применения препарата при широком спектре злокачественных заболеваний. Речь идет о воспроизводимых противоопухолевых эффектах ИФН при различных пересаживаемых экспериментальных опухолях, а также о понимании того, что ИФН способны вызывать множество других биологических эффектов, теоретически полезных организму.

Большинство приведенных в этом разделе данных относится к ИФН-*а*, а иногда и к ИФН-*В*, так как результаты клинических исследований ИФН-у еще не стали столь широко доступными. Хотя в данной области достигнуты немалые успехи (некоторые из них весьма впечатляющие), в настоящее время представляется маловероятным, что ИФН смогут занять главное место в арсенале онкологических медикаментозных средств. Однако не следует преуменьшать значение того, что применение ИФН может быть наиболее целесообразным при тех состояниях, при которых иммунологические механизмы способствуют регуляции опухолевого роста.

Лечение онкологических больных дало очень ценную информацию об эффектах *in vitro* экзогенно введенных ИФН. Несмотря на

использование в ряде исследований I фазы различных рекомбинантных ИФН и отсутствие полного согласия относительно их оптимальной дозировки, были получены весьма полезные фармакокинетические данные. Например, пик уровня ИФН в сыворотке после внутримышечного введения некоторых рекомбинантных препаратов достигается через 4-6 ч и повышается при увеличении дозы. Время полураспада составляет 6-9 ч, однако при дозах, превышающих $50 \cdot 10^6$ МЕ, может наблюдаться определенная стабильность состояния кумуляции. Максимально переносимая доза, по-видимому, находится в пределах $40-70 \cdot 10^6$ МЕ при внутримышечном дробном введении в течение недели и порядка $100-10^6$ МЕ/сут при постоянном внутривенном введении.

При лейкозе наилучшие результаты были получены в волосато-клеточном варианте; это медленно прогрессирующая форма заболевания, которая в высокой степени резистентна к химиотерапии и лишь временно поддается спленэктомии. При других формах лейкоза получены менее впечатляющие результаты. Хотя лечение иногда сопровождается падением количества периферических бластных клеток при остром лимфобластном лейкозе, полное очищение и нормализация картины костного мозга наблюдаются относительно редко.

Лимфокины индуцируются и выделяются местно, в непосредственно окружающее их пространство, они имеют короткий период полураспада и действуют главным образом на близлежащие клетки. Эти факты, вероятно, побуждают к поиску новых подходов к клиническому применению лимфокинов, таких как использование ИФН у онкологических больных, которое, возможно, предусматривает доставку интерферонов к месту поражения с помощью антител. Доступность моноклональных антител к опухолевым антигенам предполагает осуществимость такого подхода; при этом могут быть раскрыты преимущества ИФН перед другими химиотерапевтическими препаратами. Основанием для данной точки зрения является следующее: а) ИФН способен оказывать действие через собственные рецепторы и не нуждается в опосредованном антителами эндоцитозе; б) разнообразные биологические эффекты ИФН могут проявляться одновременно в точке-мишени; в) комбинация с антителами может способствовать стабилизации ИФН и продлевает их обычно короткий период полураспада. Таким образом, хотя ак-

тивность ИФН может снизиться в результате ряда классических проблем доставки препаратов к мишени (неспецифический захват печенью, отсутствие специфичности антител и т.д.), должны проявиться и его определенные преимущества перед другими химиотерапевтическими агентами или токсинами, используемыми при обычных методах воздействия.

Вряд ли ИФН станут панацеей при злокачественных новообразованиях, но дальнейшее изучение многочисленных биохимических изменений, вызываемых ИФН в клетках, может привести к идентификации пептидов, критических для регуляции клеточного роста

и функций, а также к определению молекул-мишеней для терапии другими противоопухолевыми агентами.

30 Интерлейкин-2

М.М. Даусон, М. Мур (M.M.Dawson, M. Moore)

Интерлейкин-2 был открыт при попытках длительного культивирования Т-лимфоцитов, что было необходимо для клонального анализа клеток, участвующих в клеточно-опосредованном иммунитете, а также клеток, ответственных за регуляцию иммунных реакций в целом.

Известно, что Т-лимфоциты активируются *in vitro* специфическими антигенами, неспецифическими митогенами (такими как ФГА) или антигенами клеточной поверхности аллогенных лимфоцитов (в реакции смешанных лимфоцитов), причем стимулированные клетки гибнут в культуре через несколько дней, несмотря на хорошую начальную пролиферацию.

Конкретное наблюдение, приведшее к открытию ИЛ-2, состоит в том, что стимулированные Т-клетки постоянно поддерживаются в определенных культурах, в которые с регулярными интервалами добавляются супернатанты культур ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови (ЛПК). Анализ супернатантов привел к открытию легко отделяемого от ФГА ростового фактора, который и опосредует данный эффект. Фактор, первоначально названный ростовым фактором Т-клеток, стал не только мощным лабораторным инструментом культивирования Т-клеток, но и центральной молекулой в каскаде лимфокинов; впоследствии он получил новое название - интерлейкин-2.

Помимо распознавания роли ИЛ-2 в иммунных реакциях, в настоящее время значительный интерес проявляется к его возможной ценности как терапевтического средства. Например, синдром приобретенного иммунодефицита сопровождается крайне низким уровнем ИЛ-2. Показано, что ИЛ-2 оказывает влияние по крайней мере на две популяции клеток, способных осуществлять *in vitro* лизис опухолевых клеток. Таким образом, ИЛ-2 может быть использован для усиления иммунных ответов у иммунодефицитных больных или для стимуляции иммунного ответа на ауто-

логичную опухоль. В настоящее время стали доступными некоторые результаты клинических исследований ИЛ-2; они обсуждаются ниже.

Роль ИЛ-2 *in vivo*

По крайней мере два различных типа лимфоцитов образуют ИЛ-2, а именно Т-клетка-помощник/индуктор (Т_п или Т₄) и естественные клетки-киллеры. На рис. 123 показана центральная роль ИЛ-2. Т_п секретируют ИЛ-2 в ответ на антиген, распознаваемый в ассоциации с антигенами II класса главного комплекса гистосовместимости на поверхности антигенпредставляющих клеток, а также на интерлейкин-1, продуцируемый позже.

Интерлейкин-2 является ростовым фактором, способным облегчать пролиферацию и дифференциацию любой клетки, имеющей рецептор к нему. Такие рецепторы (так называемые Тас-молекулы) присутствуют на поверхности других Т-клеток (возможно, В-клеток), стимулированных антигеном, включая Т-клетки (Т8), которые превращаются в цитотоксические (Тц) или супрессорные Т-клетки (Тс). Таким образом, специфичность ответа связана с антигеном, который стимулирует только лимфоциты, несущие специфические антигенные рецепторы. ИЛ-2, образуемый Т_п-лимфоцитами, также стимулирует Т_п к секреции факторов, отвечающих за пролиферацию и дифференциацию В-лимфоцитов (В-клеточный ростовой фактор и В-клеточный дифференцировочный фактор) в антителосекретирующие плазматические клетки. ИЛ-2, образуемый при антигенспецифической стимуляции, может также рекрутировать антигенспецифические ЕКК, часть которых (10-20%) экспрессируют Тас-рецепторные молекулы на клеточной мембране.

Эффект ИЛ-2 заключается в возрастании популяции ЕКК и повышении ее цитолитической активности, а также в увеличении про-

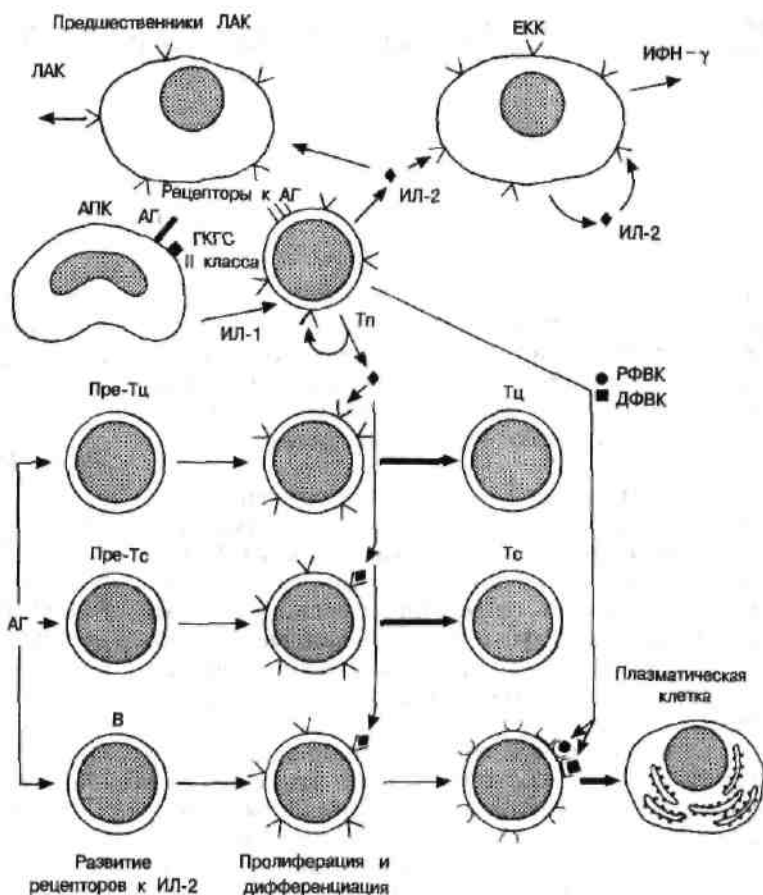


Рис. 123. Роль ИЛ-2 в каскаде лимфокинов.

Пролиферация Т-клеток-помощников (Т_п или Т₄) и выделение ИЛ-2 зависят от двух стимулов: первый - антиген, представленный антигенпрезентирующими клетками (АПК) вместе с продуктами ГКГС II класса; второй - интерлейкин-1 (ИЛ-1), ранее называемый лимфоцитактивирующим фактором (ЛАФ). Нефизиологические стимулы, такие как лектины, могут замещать антиген в сигнале аксессуарных клеток. ИЛ-2 стимулирует рост и дифференциацию активированных лимфоцитов, таких как предшественники цитотоксических/ супрессорных клеток (Т_ц/с или Т₈) и В-лимфоцитов, хотя для полной пролиферации и дифференциации В-клеток требуется ростовой фактор В-клеток (РФВК) и дифференцировочный фактор В-клеток (ДФВК), образуемые Т_п. ИЛ-2 также стимулирует ЕКК и предшественники ЛАК.

дукции интерферона- γ этими клетками. Более того, ИЛ-2 способствует образованию еще большего количества ИЛ-2 ЕКК за счет системы положительной обратной связи. Кроме того, ИЛ-2 может стимулировать клетки, отличающиеся как от Т-клеток, так и от ЕКК. При этом в результате пролиферации и дифференциации образуются эффекторные клетки, известные как киллеры, активируемые лимфокинами (ЛАК). Точное происхождение этих клеток неясно, но они несут некоторые маркеры Т-клеток и активны в отношении широкого ряда опухолей *in vitro*, в том числе в отношении мишеней, резистентных к другим формам клеточно-опосредованного цитолиза.

Основные признаки иммуномодулирующего действия ИЛ-2 на ЕКК и на предшественники ЛАК могут быть суммированы определенным образом (см. следующие разделы).

Естественные клетки-киллеры

ИЛ-2 вызывает увеличение пролиферации (а), цитотоксичности ЛПК в отношении клеток-мишеней (б) и продукции ИФН- γ (в). Хотя ИФН- γ способен самостоятельно вызывать повышение активности ЕКК, эффект ИЛ-2 является прямым и не зависит от ИФН- γ . Так, повышение цитотоксичности становится заметным через 1-4 ч инкубации с ИЛ-2 и может быть заблокировано циклогексимидом, ингибитором белкового синтеза. Анти-Тас-антите-ла, которые предупреждают индукцию ИФН- γ , не влияют на повышение цитотоксичности в этих условиях.

Гибель, индуцированная лимфокинами

ЛАК-клетки генерируются в культурах лимфоидных клеток, которые инкубируют с ИЛ-2 минимум 2 дня. Образующиеся клетки способ-

ны вызывать гибель широкого ряда свежих аутологичных и аллогенных опухолей, нечувствительных к ЕКК, в то время как нормальные клетки, например лимфоциты, остаются рефрактерными. Предшественники ЛАК-клеток обнаруживаются в местах, где ЕКК в норме не встречаются (например, во внесосудистой лимфоидной ткани), и несут не всегда легко идентифицируемые фенотипические маркеры, по которым их классифицируют. Однако после стимуляции эффектор-ные клетки несут общий маркер Т-клеток-

ОКТ-3.

Источники ИЛ-2

Первоначально ИЛ-2 был получен в неочищенном виде из супернатантов ЛПК, стимулированных ФГА. Однако ввиду наличия в таких препаратах лектина и других контаминирующих лимфокинов потребовалась их интенсивная очистка биохимическими методами, прежде чем способность облегчения роста клеток смогла быть однозначно приписана ИЛ-2.

Технология очистки включает в себя жидкостную хроматографию высокого разрешения и аффинную хроматографию.

Открытие двух клеточных линий, постоянно продуцирующих ИЛ-2, сделало его широкодоступным в незагрязненном (лектином) виде и в первое время относительно дешевым. Эти культуры клеток, а именно JURKAT (Т-клеточная лимфома человека) и MLA-144

(лимфобластоидная линия бабуинов), служили основным источником ИЛ-2 до получения рекомбинантного (р) ИЛ-2, приготовляемого при клонировании гена ИЛ-2 JURKAT и его экспрессии в *E.coli*. Вне зависимости от используемого источника ИЛ-2 перед применением должен быть всегда оттитрован, что достигается, например, определением его способности: а) поддерживать пролиферацию ЛПК, стимулированных митогеном, или линии ЦТЛ, зависимой от ИЛ-2; б) усиливать стимуляцию тимоцитов, обработанных ФГА. Однако постоянно остается неопределенность в отношении того, что составляет единицу активности ИЛ-2, поэтому при сравнении данных, полученных с помощью ИЛ-2 из разных источников или из разных лабораторий, следует проявлять некоторую осторожность.

Молекулярные характеристики

У человека ИЛ-2 является продуктом одного неаллельного гена, расположенного в 4-й хромосоме. Первичным продуктом трансляции является одна полипептидная цепь, состоящая из 133 аминокислот (рис. 124). ИЛ-2, полученный из разных источников, отличается по количеству углеводов, которые после трансляции присоединяются, вероятно, к остатку треонина в 3-й позиции. Вклад углевода отражается на молекулярной массе (15 000-18000) и на изоэлектрической точке (4,2-8,2). Гликозилирование не представляется необходимым для биологической активности; рекомбинантный ИЛ-2

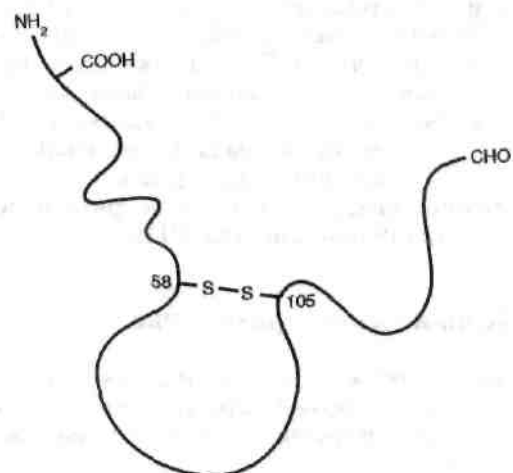


Рис. 124. Предполагаемая молекулярная структура интерлейкина-2 человека.

Молекула представляет собой гликопротеин, состоящий из 133 аминокислот. Единственно возможным местом гликозилирования является остаток треонина в 3-й позиции. Для активности необходима дисульфидная связь между двумя цистеиновыми остатками.

не содержит углеводов, однако они могут оказывать влияние на скорость клиренса *in vivo*. Внутримолекулярная дисульфидная связь между 58-м и 105-м аминокислотным остатком необходима для биологической активности, которая теряется при восстановлении и алкилировании.

Механизм действия

Интерлейкин-2 проявляет свое биологическое действие через рецепторы клеточной поверхности на активированных Т- и В-клетках и на ЕКК. Количество рецепторов находится в пределах 4000- 8000 на Т-клеточных бластах, причем их максимум достигается на 3- 5-й день после стимуляции ФГА. Моноклональные антитела к активированным Т-клеткам (Тас) идентифицируют предполагаемый рецептор-Тас-антиген. Эта молекула, возможно, является белком с молекулярной массой 55 000 и внутримолекулярными дисульфидными связями. Тас-антиген способен к гликозилированию, фосфорилированию и сульфатированию. Явные несоответствия, отмечаемые при влиянии анти-Тас на некоторые формы активности, вызываемой ИЛ-2, могут объясняться предположительным существованием высоко- и низкоаффинных рецепторов для ИЛ-2. Недавно было показано, что высокоаффинный рецептор для ИЛ-2 представлен двухцепочечной структурой. Комплекс, образовавшийся после связывания ИЛ-2 с рецептором клеточной поверхности, интернализируется при $t_{1/2} = 25-30$ мин. О природе биологических событий, вызванных взаимодействием лиганд- рецептор, известно немного, однако наши знания о ней постепенно расширяются в связи с доступностью чистых рекомбинантных молекул. Известно, что ИЛ-2 способствует прохождению клеток из поздней фазы G1 в S-фазу клеточного цикла и что взаимодействие лиганд-рецептор вызывает увеличение количества трансферриновых рецепторов, а последующее связывание трансферрина необходимо для инициации синтеза ДНК.

Клиническое применение

Здесь обсуждаются клинические ситуации, в которых возможно применение ИЛ-2. Его клиническое изучение находится на начальном этапе.

Только недавно были получены результаты I ряда клинических испытаний I фазы и (в меньшей степени) II фазы; они также будут обсуждены ниже. Двумя основными областями, представляющими интерес для внедрения ИЛ-2, являются синдром приобретенного иммунного дефицита и онкологические заболевания, при которых необходимо восстановление или повышение иммунокомпетентности. Однако иммунитет представляет собой сложную и тонко регулируемую систему со многими соприкасающимися регуляторными циклами. Поскольку известно, что ИЛ-2 является центральной молекулой в такого рода взаимодействиях, можно предположить, что его введение способно привести к непредсказуемым эффектам, увеличив потенциально вредные для организма популяции клеток (например, супрессорные клетки), как и популяции, необходимые для благоприятного исхода (например, цитотоксические клетки и клетки-помощники). Аналогично этому, не исключается, что ИЛ-2, введенный больным СПИДом, может облегчить пролиферацию Т-клеток-помощников, содержащих этиологический агент, и обусловить усиление репликации вирусов. В настоящее время ИЛ-2 применяется только у тех онкологических больных, у кого обычное лечение (т.е. хирургическое удаление опухоли, облучение и/или химиотерапия) оказалось безуспешным, что, несомненно, дает свои результаты.

СПИД

Этиологическим агентом СПИДа является ретровирус типа С - вирус иммунодефицита человека (**ВИЧ**), известный также как вирус лимфаденопатии (LAV) и человеческий Т-клеточный лимфотрофический вирус (HTLV III). Этот вирус, эндемичный в некоторых частях Африки, часто встречается среди определенных групп населения: у гомосексуалистов, наркоманов, использующих внутривенные инъекции, и у больных гемофилией. Он распространяется главным образом через кровь и половым путем. **ВИЧ** проникает в организм и реплицирует в Тп-клетках, что приводит к потере активности последних и исчезновению клеточных маркеров. Таким образом, у больных СПИДом и с синдромом преСПИДа (продрома) соотношение Тп и Тс (Т₄ и Т₈) находится в пределах 0,2-0,8:1 (вместо нормального 2:1). Потеря активности Тп обуславливает ряд иммунологических нарушений, включая снижение

функции Т-клеток и поликлональную активацию В-клеток (возможно, связанную с вирусом Эпштейна-Барра). Потеря T_H in vivo проявляется сильными оппортунистическими инфекциями, вызванными *Pneumocystis carinii* и цитомегаловирусом, иммунологической аллергией, определяемой кожными тестами с панелью общих антигенов (возбудитель свинки, трихофитон, ППД), и развитием новообразований, особенно саркомы Капоши. Саркома Капоши представляет собой опухоль кожи, которая проявляется во многих местах, а при СПИДе характеризуется значительной диссеминацией и быстрым прогрессированием. Митоген- и антигениндуцированная бласттрансформация ЛПК in vitro крайне низка; уменьшена также продукция ИЛ-2 и ИФН. Активность ЕКК может полностью отсутствовать, но большая ее часть восстанавливается при инкубации ЛПК с ИЛ-2.

Иммунодефицит при СПИДе и родственных ему синдромах может быть как количественным, так и качественным, например, при снижении способности клеток к экспрессии рецепторов к ИЛ-2.

Рак

Существует целый ряд данных, свидетельствующих в пользу того, что интактная иммунная система способна защитить организм от развития опухолей. Поэтому клиническое проявление опухолей происходит в результате нарушения иммунологического надзора. Возможными кандидатами для осуществления иммунологического надзора представляются ЕКК, ЛАК, опухолеспецифические цитотоксические Т-клетки, причем их функции не являются взаимоисключающими. В недавних экспериментах in vitro показано, что ЛАК, образуемые при культивировании с ИЛ-2, обладают достаточной специфичностью по отношению к широкому спектру опухолей (но не к нормальным клеткам), что послужило основой программы клинических исследований, включающих введение онкологическим больным ИЛ-2 совместно с ЛАК (или без него). Данный иммунотерапевтический подход также разработан в эксперименте на мышах, у которых лечение ЛАК и ИЛ-2 резко уменьшает метастазы, возникающие вследствие местного введения небольшого количества инокулюмов опухолевых клеток. Подобное лечение вызывает регрессию развившихся легочных метастазов меланомы у мышей.

Клинические исследования и фармакокинетика

Токсичность

Интерлейкин-2, введенный внутривенно людям, имеет период полураспада в сыворотке ($t_{1/2}$) 5-7 мин, что хорошо коррелирует с результатами у мышей. У здоровых людей выявлены сывороточные ингибиторы ИЛ-2. Хотя $t_{1/2}$ можно увеличить с помощью подкожного или внутривенного введения препарата, для клинического использования, вероятно, потребовались бы частые внутривенные инъекции или постоянная инфузия в течение длительного времени. Как правило, введение ИЛ-2 больным СПИДом или онкологическим больным сопровождается минимальной токсичностью.

Наиболее часто регистрируемые побочные эффекты перечислены в табл. 38. Большинство симптомов легко контролируется; например, лихорадку можно снять парацетамолом. В одном исследовании отмечена хорошая переносимость доз до 10^5 МЕ/м² (но не 10^6 МЕ/м²). Сходные результаты получены независимо от режима введения ИЛ-2 (однократная инъекция или длительное внутривенное вливание). При внутривенном введении ИЛ-2 в хорошо переносимых дозах его уровень в сыворотке становится вполне определяемым вскоре после инъекции, причем время его полураспада составляет 6 мин. При таком уровне препарата не наблюдается легочной, гематологической и печеночной интоксикации. Однако в одном исследовании (см. табл. 38) отмечены гораздо более сильные побочные эффекты ИЛ-2, правда, при более высоких общих дозах. В этом исследовании общие дозы $2,8 \cdot 10^5$ и $3,32 \cdot 10^6$ МЕ/кг (давались в течение нескольких недель) часто приводили к выраженной задержке жидкости, что нередко сопровождалось легочным интерстициальным отеком и тяжелым респираторным дистрессом у 10% больных. Причина задержки жидкости неизвестна.

Терапевтическая эффективность

В настоящее время эффективность лечения ИЛ-2 можно прокомментировать лишь в общих выражениях, поскольку завершено только небольшое количество клинических исследований.

Таблица 38. Токсичность ИЛ-2 при лечении различных заболеваний

Заболевание	Доза и способ введения ИЛ-2	Токсичность
СПИД	10^3 – 10^6 МЕ/м ² , однократное введение или 4-часовая инфузия	10^3 – 10^5 МЕ/м ² переносимы; 10^6 МЕ – лихорадка, озноб, тошнота; общее недомогание, лимфоцитоз; эозинофилия
СПИД	$2,5 \cdot 10^2$ – $2,5 \cdot 10^5$ МЕ, длительное введение (5 дней в неделю) в течение 4 нед	Минимальная токсичность
СПИД Лимфома	Максимальная ежедневная доза $2 \cdot 10^4$ МЕ/м ² Максимальная ежедневная доза $8,55 \cdot 10^5$ МЕ/м ²	Минимальная токсичность
ТКИД		
Саркома Капоши при СПИДе СПИД и рак	10^3 – 10^4 МЕ/м ² 3 раза в неделю в течение 8 нед 0,25–25 мкг/кг, однократно или в течение 24 ч еженедельно, 4 нед	Минимальная токсичность Головная боль, тошнота, общее недомогание, озноб
Рак	Общая доза $2,8 \cdot 10^5$ – $3,32 \cdot 10^6$ МЕ/кг, разделенная на ряд доз (до 90) в течение нескольких недель, и аутологичные ЛАК	Задержка жидкости, приводящая к выраженному отеку легких

СПИД. При лечении не наблюдается объективной регрессии саркомы Капоши, хотя некоторые поражения становятся менее ограниченными и слегка уменьшаются в размерах. Не установлено четкой связи между введением ИЛ-2 и отношением Тп-Тс (Т₄-Т₈), хотя в одной группе отмечено снижение уровня Тс (Т₈), что привело к общему повышению отношения. В одном исследовании выявлено локальное увеличение лимфатического узла, дренирующего место инъекции у ребенка, который умер вскоре после начала лечения; другие же лимфатические узлы остались без изменений.

В настоящее время нет сомнений в том, что ИЛ-2 может восстанавливать способность ЛПК у больных СПИДом реагировать, например, на ФГА или ЦМВ пролиферацией *in vitro*; однако положительные клинические эффекты отмечаются редко, что может быть связано с невозможностью поддержания высокого уровня препарата в течение длительного времени ввиду короткого периода его полураспада. Будущее эффективное лечение СПИДа, видимо, должно быть связано с разработкой препаратов, направленных против ВИЧ, разрушение которого почти неизбежно приведет к восстановлению иммунокомпетентности.

Рак. Наиболее обнадеживающие результаты применения ИЛ-2 у онкологических больных получены при его введении с ЛАК. В од-

ном исследовании введение аутологичных ЛАК в рецидивирующие узлы меланомы и опухоли легких привело либо к остановке роста и частичной регрессии поражений, либо (редко) к их полной регрессии. Реагирующие поражения были инфильтрированы лимфоидными клетками и макрофагами. Однако установить идеальное соотношение эффектор-мишень при больших опухолевых массах весьма трудно; этот фактор в значительной степени ограничивает клиническое применение введения препарата в опухоль. Самое большое из известных клинических испытаний проведено Rosenberg и соавт. в Национальном институте рака в США. В этом исследовании 25 больных с метастазами рака получили аутологичные ЛАК (от 2 до $18 \cdot 10^{10}$ клеток), выделенных при повторных лимфоцитозеразах, в сочетании с ИЛ-2 (до 90 доз); общая доза – от $2,8 \cdot 10^5$ МЕ/кг до $3,32 \cdot 10^6$ МЕ/кг. Объективная регрессия (т.е. 50% уменьшение объема опухоли) отмечена у 11 больных, включая полную регрессию у одного больного меланомой. Частичные ответы наблюдались у 10 больных. Следует отметить, что повышенные дозы ИЛ-2 вызывают выраженную задержку жидкости, поэтому совершенно очевидна необходимость преодоления столь нежелательных эффектов, что позволило бы использовать более высокие дозы препарата, которые могут потребоваться для достижения полной регрессии опухолей.

При некоторых формах лейкоза клетки имеют Тас-рецепторы, и введение ИЛ-2, вероятно, вызовет их пролиферацию; возможным лечением в этом случае представляется введение анти-Тас-антител. Тас-рецепторы обнаружены на всех HTLV I-позитивных лейкомиях взрослых, но не выявлены при синдроме Сезари (HTLV I-негативный). Тас-рецепторы найдены при всех волосато-клеточных лейкозах и на некоторых клетках лимфомы Бер-китта.

Начаты исследования с анти-Тас-антителами, что дает дополнительную возможность доставки поражающих препаратов, таких как ризин, с помощью этих антител.

31 Хлорохин

М.М. Дейл (M.M. Dale)

4-Аминохинолины, хлорохин и гидроксихлорохин были синтезированы во время второй мировой войны в качестве препаратов для лечения малярии. Их использование как противовоспалительных средств началось в 1951 г., когда другой противомалярийный препарат мепакрин стал эмпирически применяться для лечения больных с дискоидной красной волчанкой. Поскольку мепакрин обладает побочными эффектами, вместо него стали использовать хлорохин и гидроксихлорохин. В начале 60-х годов четыре полномасштабные контролируемые программы показали достаточную эффективность обоих препаратов при лечении ревматоидного артрита; позже их стали применять и для лечения системной красной волчанки. В данной главе противовоспалительное действие 4-аминохинолинов и особенно хлорохина обсуждается в контексте лечения ревматоидного артрита, поскольку при этом заболевании они наиболее часто используются как противовоспалительные средства. Для оценки их эффективности при ревматоидном артрите, а также для обсуждения возможных механизмов их действия необходимо коротко представить характеристики и патогенез этого заболевания.

Ревматоидный артрит

Ревматоидный артрит (РА) является хроническим воспалительным заболеванием, поражающим преимущественно суставы, хотя наблюдаются и другие системные проявления, в том числе поражение кожи, легких, ЦНС, сердечно-сосудистой системы и крови.

Артрит поражает в основном дистальные суставы (пальцев, запястья и др.). В суставах наблюдается воспаление синовиальных оболочек, которые постепенно утолщаются (вследствие клеточной инфильтрации) и разрастаются, вторгаясь в синовиальный хрящ и образуя так называемый паннус (рис. 125). Затем происходят эрозия кости, истончение и рассасывание суставного хряща. Ослабевают капсулы сус-

тавов и поддерживающие их связки, а со временем между противоположными суставными поверхностями образуются фиброзные спайки. Следующим этапом является костный анкилоз (соединение костных поверхностей сустава). Области хронической воспалительной активности-ревматоидные узелки - возникают в основном на коже, но могут также обнаруживаться в легких и сердце. Часто наблюдается воспаление кровеносных сосудов (васкулиты), главным образом малых и средних артерий.

Патологическое состояние развивается постепенно, прогрессируя в течение нескольких лет. Основными симптомами являются боль, скованность в движениях и постепенная потеря функции пораженных суставов. На хроническое воспаление суставов накладываются эпизоды острого воспаления, когда суставы становятся отечными, горячими на ощупь и более болезненными, чем обычно.

Основа таких изменений продолжает оставаться предметом споров, хотя участие в них неадекватной иммунной реакции является общепризнанным. Патогенез заболевания и связанные с ним события описаны ниже.

Вещества, входящие в состав сустава (возможно, производные хряща), становятся аутоантигенами, которые стимулируют лимфоциты. Местные Т-лимфоциты выделяют факторы, активирующие синовиальные макрофаги, которые в свою очередь продуцируют интерлейкин-1 (см. главу 15). Местно расположенные В-лимфоциты синтезируют антитела, направленные против аутоантигенов, а образующиеся комплексы антиген - антитело активируют комплемент (РА обычно классифицируется как болезнь иммунных комплексов). Вовлекаются и активируются нейтрофилы и макрофаги, выделяющие лизосомные ферменты и токсические продукты кислорода. Тканевые повреждения поддерживаются в течение длительного времени, возможно, продуктами макрофагов, веществами, выделяемыми хондроцитами и синовиальными клетками, а также остеокластной активностью. Возможно, в фазу острого артрита активное участие принимают

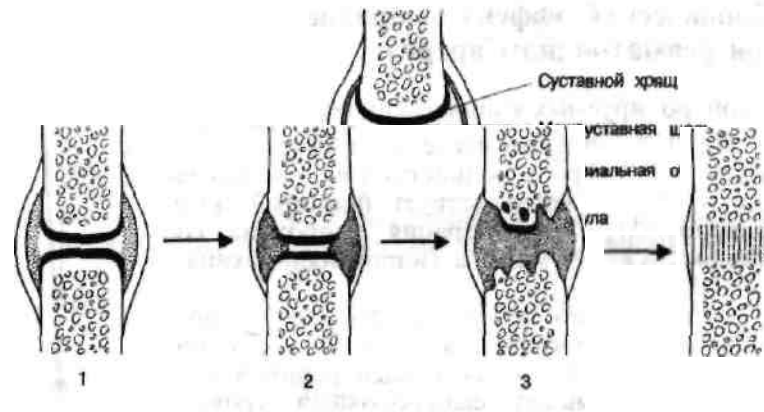


Рис. 125. Нормальный крупный сустав (верхний фрагмент рисунка) и прогрессирующие изменения сустава при ревматоидном артрите: 1 - постепенное утолщение синовиальной оболочки; 2 - повреждение суставного хряща; 3 - эрозия кости; 4 - соединение суставных поверхностей спайками, а затем костью. (По Handerson и др., 1987.)

нейтрофилы. Цитотоксические Т-лимфоциты также могут играть определенную роль в повреждении тканей. По общему мнению, среди медиаторов при ревматоидном артрите наиболее важным является интерлейкин-1. Он обладает многими различными эффектами, которые приводят не только к повреждению хряща, но и к дальнейшей стимуляции всех клеток, участвующих в воспалительном процессе, включая фибробласты (см. главу 15).

Здесь совершенно очевидно участие самоподдерживающегося механизма, ибо если бы он отсутствовал, состояние разрешилось бы. Одна из возможных причин прогрессирующего характера заболевания заключается в том, что первоначальный воспалительный процесс, повреждая хрящ, генерирует новые аутоантигены. Другая причина заключается в токсическом действии продуктов кислорода; они образуются активированными макрофагами и нейтрофилами, которые повреждают находящиеся в суставах иммуноглобулиновые молекулы, что обуславливает возникновение иммуногенности и выработку антител. (Антитела к IgG, называемые «ревматоидным фактором», действительно обнаруживаются в суставах и сыворотке у большинства больных ревматоидным артритом.) Иммунные комплексы могут стимулировать фагоцитирующие клетки, которые продуцируют интерлейкин-1 и (или) пере-

киси водорода, вызывающие новые повреждения IgG.

Из вышесказанного совершенно очевидна сложность патогенеза ревматоидного артрита.

Значение хлорохина в лечении ревматоидного артрита

Для лечения ревматоидного артрита используются три основные группы препаратов.

I. Нестероидные противовоспалительные препараты. Они уменьшают боль и тугоподвижность суставов, но не останавливают прогрессирования заболевания.

II. Препараты, модифицирующие заболевание, такие как золото (см. главу 32), пеницилламин (см. главу 33) и 4-аминохинолины (хлорохин). Последний по своей эффективности в основном уступает золоту и пеницилламину, но он менее токсичен при длительном применении.

III. Иммунодепрессанты - метотрексат, азатиоприн и циклофосфамид (см. главу 27).

Следует отметить, что ни один из этих препаратов не излечивает от ревматоидного артрита. Две последние группы препаратов лишь улучшают клиническую картину и замедляют прогрессирование заболевания, а первая группа только смягчает его признаки и симптомы.

Клинический эффект хлорохина при ревматоидном артрите

В контролируемых клинических исследованиях с двойным слепым контролем примерно две трети больных реагировали на хлорохин, хотя полная ремиссия достигалась только у 12% из них. У многих больных отмечалось замедление рентгенологического прогрессирования суставной патологии. Кроме того, обнаруживалось легкое подавление воспалительной реакции, а также снижение уровня циркулирующих иммунных комплексов и ревматоидного фактора.

При пероральном введении препараты всасываются быстро и полностью; их концентрация в плазме соответствует принятой дозе. Сывороточная концентрация хлорохина составляет 0,6-0,9 мкМ, а гидроксихлорохина-1,4-1,5 мкМ.

Относительно небольшие количества препаратов обнаруживаются в костях и сухожилиях, зато в печени их концентрация в сотни раз превышает сывороточный уровень (100 мкМ). Препараты определяются в хорио-идальном и цилиарном телах глаза, а при длительном приеме больших доз выявляются токсические эффекты в сетчатке. Максимальная безопасная терапевтическая доза составляет 4 мг/кг в день.

Возможные механизмы действия

В исследованиях *in vitro* было показано разностороннее влияние 4-аминохинолинов на различные параметры воспалительной реакции. Ясно, что для интерпретации клинической эффективности имеют значение лишь те эффекты препаратов, которые вызываются ими при концентрациях, аналогичных достигаемым *in vivo*.

Их основным эффектом является действие на внутриклеточные органеллы, такие как эндосомы и лизосомы¹, а также на нуклеопротеины. Эти эффекты отражаются на функциях воспалительных клеток, а также на генерировании и(или) выделении воспалительных медиаторов.

Действие на внутриклеточные органеллы

Основное действие хлорохина почти наверняка связано с распределением препарата во внут-

¹ Лизосомотропизм хлорохина был показан de Duve и др. в 1974 г.

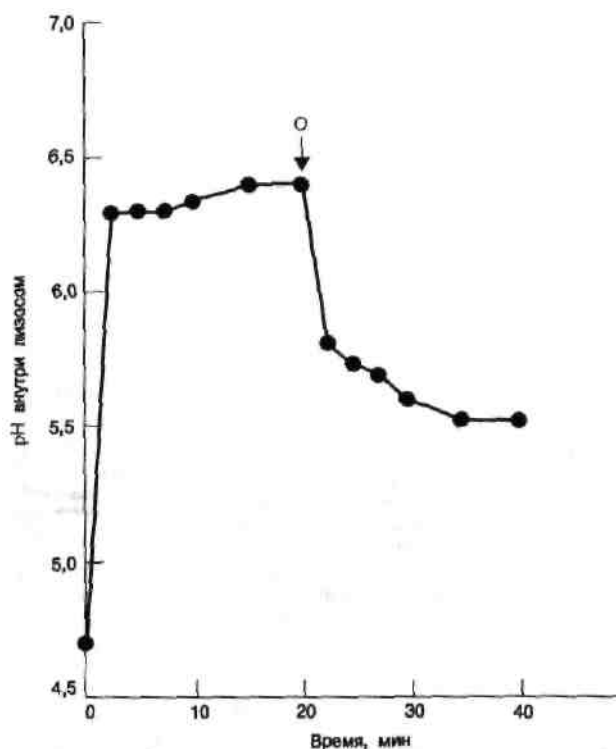


Рис. 126. Влияние хлорохина (хингамина) на внутрилизосомный pH макрофагов. В первые 20 мин проводилась перфузия средой, содержащей 10 мкМ хлорохина. (По Okhuma, Poole, 1978.)

рикеточных органеллах с низкими значениями pH. Недиссоциированное вещество способно проникать через клеточные мембраны в такие органеллы, как эндосомы (с pH около 5) и лизосомы (где pH равен 4). В обоих клеточных отсеках закисление достигается посредством электрогенных протонных насосов. После проникновения в эти органеллы соединения протонируются, становясь менее липофильными. Таким образом, препараты улавливаются данными отсеками, в результате чего pH органелл возрастает. Под действием хлорохина pH лизосом может достигнуть 6 (рис. 126).

Действие препарата определенным образом сказывается на таких функциях органелл, как рециклинг рецепторов в эндосомах и протеолиз в лизосомах.

Рецепторы клеточной поверхности ряда лигандов интернализируются после взаимодействия лиганд-рецептор. Комплексы лиганд-рецептор сначала образуют углубление, покрытое клатрином, а затем погружаются внутрь

в закрытых везикулах, из которых исключена значительная часть мембранного белка. Это приводит к 1000-10000-кратному повышению концентрации рецепторных белков по отношению к плазматической мембране. Покрытие везикулы сдувают клатрин, и при слиянии нескольких везикул образуются эндосомы с рН, равным 5.

Большинство рецепторов связывает лиганды при рН 7 и легко диссоциирует при рН 5. Некоторые типы рецепторов возвращаются в плазматическую мембрану, а их лиганды проходят в лизосомы для деградации. Ряд гормональных рецепторов не отсоединяется от своих лигандов и целиком комплексом попадает в лизосомы. Последующая деградация комплекса используется для обратной регуляции рецептора. Некоторые типы рецепторов постоянно интернализируются даже в отсутствие лиганда (рис. 127).

В отличие от эндосом только прелизосомальные отсеки играют важную роль в транспорте белков из одной части клетки в другую, и их функция аналогична функции комплекса Гольджи в биосинтетическом белковом отборе.

Хлорохин и другие слабые основания (метиламин, NH_4Cl), как и ионофоры, вызывают повышение рН в этих внутриклеточных

отсеках, влияют на рециклинг рецепторов через эндосомы: рецепторы остаются в органеллах, и их число на клеточной поверхности уменьшается. Препараты влияют и на функцию лизосом, в результате чего снижается внутрилизосомальный протеолиз.

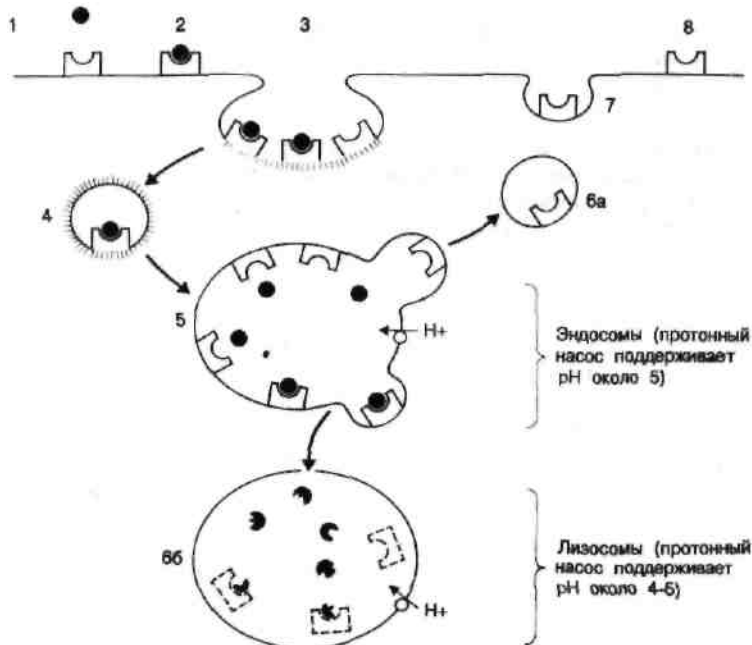
Однако некоторые авторы считают, что рециклинг не абсолютно зависит от низких значений рН эндосом и лизосом, а указанные препараты лишь замедляют его, но не блокируют полностью.

Кроме того, хлорохин подавляет слияние внутриклеточных везикул, вследствие чего их число и объем возрастают, а плотность уменьшается. Это может быть результатом изменения рН. В некоторых клетках подавление слияния везикул может быть связано с эк-зоцитозом.

В большинстве экспериментальных исследований влияния хлорохина на рН внутриклеточных органелл использовались более высокие концентрации препарата, чем те, которые могут быть достигнуты в клинических условиях. Так, Okhuma и Poole (1978) в классическом исследовании этого эффекта использовали концентрацию 100 мкМ (см. рис. 126). Однако необходимо отметить, что ввиду неравномерного распределения препарата в клетке и, следовательно, его аккумуляции более

Рис. 127. Схема эндоцитоза и рециклинга рецепторов.

1-рецептор на клеточной мембране; 2- взаимодействие лиганда (темные кружки) с рецептором; 3 - кластеризация комплексов лиганд-рецептор и незанятых рецепторов в углублениях; 4- интернализация комплексов лиганд-рецептор и незанятых рецепторов в везикулах; 5- доставка рецепторов и комплексов лиганд-рецептор в эндосомы с низким рН (около 5) вследствие активности H^+ -АТФазы, протонного насоса; многие комплексы лиганд-рецептор диссоциируют; 6а, 7, 8- возвращение незанятых рецепторов к мембране; 6б- доставка свободных лигандов (и некоторых типов комплексов лиганд-рецептор) в лизосомы, которые также обладают протонным насосом и низким рН. Лизосомные ферменты вызывают деградацию лигандов и комплексов лиганд-рецептор. Хлорохин (слабое основание), попадая в эндосомы и лизосомы, протонируется и секвестрируется. В указанных внутриклеточных органеллах происходит увеличение рН, что изменяет их функцию.



низкие концентрации со временем будут иметь тот же эффект.

Действие на нуклеопротеины

Другим возможным объяснением противовоспалительного эффекта хлорохина является его действие на нуклеопротеины. Хлорохин связывается с ДНК и РНК, нарушая эксцизию и репарацию и снижая эффективность поли-мераз. Эксперименты, в которых получены приведенные данные, выполнялись на микроорганизмах, поэтому четкие доказательства значимости этого эффекта у человека при использовании концентраций, достигаемых в клинике, пока отсутствуют.

Действие на ферменты

Хлорохин, как и родственный ему препарат мепакрин, обладает ингибиторным действием на фосфолипазу A_2 только в концентрациях, значительно превышающих уровни, достигаемые в клинике при безопасном дозировании. Так, препарат в концентрации 30 мкМ *in vitro* уменьшает на 50% выделение простагландинов воспаленной синовиальной оболочкой.

Действие на воспалительные клетки

Лимфоциты

Клеткам, подвергающимся митозу, необходимо контролируемое воспроизведение клеточного содержимого, поэтому неудивительно, что количество лизосом и их активность в лимфоцитах повышаются при трансформации и клональной экспансии. Подавление этой активности, вероятно, является основой документированного угнетения хлорохином активации Т-лимфоцитов (индуцированной митогеном) и может играть определенную роль в его эффектах *in vivo* при ревматоидном артрите. ED_{50} этой активности хлорохина находится в пределах 10-15 мкМ, а максимальный эффект достигается при концентрации 100 мкМ. Очень слабое подавление определяется при концентрациях ниже 3 мкМ.

Однако индуцированная митогеном активация лимфоцитов не может служить надежным ориентиром для более сложной реакции на антиген *in vivo*, и в терапевтических концентрациях хлорохин может эффективно

влиять на вызванную антигеном активацию лимфоцитов в ревматоидном суставе.

Возможно, гораздо важнее то, что хлорохин уменьшает формирование антителообразующих клеток при концентрации 2,4 мкМ, влияя в основном на ранние события клональной экспансии В-клеток, что, вероятно, связано с секрецией интерлейкина-1 (см. ниже).

Макрофаги

Получены данные, свидетельствующие о том, что даже у нестимулированных макрофагов часть клеточной мембраны (эквивалентная всей поверхности клетки) интернализируется и рециклирует каждые 30 мин и что некоторые рецепторы рециклируют в отсутствие лиганда. Как было показано, хлорохин подавляет это рециклирование, а также внутриклеточный процессинг антигена макрофагами и его последующее представление Т-клеткам. ED_{50} в первом случае составляет 100 мкМ, а во втором - 10 мкМ; однако почти 20% подавление процессинга антигена и связывания Т-клетки с макрофагом может быть получено при концентрации 1 мкМ. Как уже отмечалось, даже более низкие концентрации могут быть эффективными, поскольку в клетке происходит перераспределение препарата и, следовательно, его накопление в соответствующих внутриклеточных органеллах. Если, как предполагается, местная иммунная реакция на аутоантиген участвует в патогенезе ревматоидного артрита, то влияние на процесс обработки антигена вполне может быть основой противовоспалительного действия хлорохина. Парадокс заключается в том, что не все иммунные реакции, в том числе на патоген, нарушаются подобным образом. Этот парадокс можно объяснить, допустив, что хлорохин не нарушает обработки антигена специализированными фагоцитирующими антигенпредставляющими клетками лимфатических узлов. Однако информация по этому вопросу отсутствует. Умеренное влияние на рециклинг рецепторов также может нарушить постулированный самоподдерживающийся механизм, в котором комплексы антител и модифицированных иммуноглобулинов стимулируют макрофаги к выделению перекиси, вызывающей затем изменение иммуноглобулина. Образование макрофагами медиаторов (особенно интерлейкина-1; см. ниже), вероятно, также может быть снижено за счет известного действия хлорохина на внутриклеточные органеллы.

Показано, что хлорохин нарушает выделение кислых гидролиз *in vitro*, однако это действие, видимо, не имеет отношения к эффектам препарата *in vivo*, поскольку EC_{50} превышает 200 мкМ.

Нейтрофилы

Хлорохин в концентрации 1-10 мкг/мл не влияет на хемотаксис нейтрофилов, однако *in vitro* показан ряд других эффектов препарата в отношении функций нейтрофилов. Так, хлорохин в очень высокой концентрации (1 мМ) подавляет выделение лизосомных ферментов, но пропранолол, не обладающий противовоспалительным действием, не менее эффективен и при более низкой концентрации (100 мкМ). Сообщается также о подавлении окислительного метаболизма и снижении образования перекиси, однако EC_{50} хлорохина при этом превышает 100 мкМ и действие полностью отсутствует при концентрации 10 мкМ.

Проведенные исследования показывают, что в терапевтических концентрациях хлорохин слабо влияет на функции нейтрофилов. Однако не следует забывать, что медленное накопление препарата происходит даже при более низких концентрациях (см. выше), вызывая нарушение функции клеток.

Фибробласты

Большинство ранних исследований влияния хлорохина на функции внутриклеточных органелл выполнялось на фибробластах. В этих работах хлорохин использовался как средство анализа наблюдаемых процессов, поэтому дозовая зависимость не исследовалась. Препарат заметно уменьшал количество центров связывания на поверхности и снижал пиноцитоз, а также нарушал деградацию белков и липопротеинов низкой плотности. Используемые концентрации находились в пределах 10-100 мкМ, а при концентрациях, достигаемых *in vivo*, эффекты не обнаруживались, однако опять-таки следует помнить о возможности медленной аккумуляции препарата в клетке (см. выше).

Действие на медиаторы воспаления

Если образование и выделение медиаторов воспаления включают рециклинг рецепторов и(или) участие описанных выше внутриклеточ-

ных органелл, то влияние на них хлорохина весьма вероятно. Имеются вполне определенные данные о том, что хлорохин в концентрации 2,4 мкМ подавляет выделение интерлейкина-1. Поскольку этот медиатор играет главную роль в патогенезе ревматоидного артрита, данный эффект препарата, видимо, имеет важное значение для его противовоспалительного действия.

Точные экспериментальные данные относительно действия хлорохина на другие медиаторы, выделение которых связано с экзоцитозом (например, гистамин), пока не опубликованы; отсутствует и какая-либо информация о влиянии препарата на образование интерлейкина-2 или других лимфокинов.

Не получено данных, свидетельствующих о действии хлорохина на ферменты, участвующие в образовании кининов, а используемые концентрации препарата, которые ингибируют фосфолипазу A_2 и, следовательно, образование фактора активации тромбоцитов и эйкозаноидов, превышают уровни, достижимые в клинике.

Действие хлорохина

в экспериментальных моделях

Поскольку не существует валидных специфических моделей ревматоидного артрита, экспериментальные исследования влияния хлорохина на иммунологические процессы у животных *in vivo* имеют ограниченную ценность. В различных исследованиях препарат оказывал слабое влияние на адьювантный артрит (у крыс) или на иммунологически индуцированный моноартрит (у кроликов), хотя не исключено, что режим и длительность терапии не были оптимальными. При введении хлорохина кроликам в течение более 20 нед в дозах, соответствующих клиническим, не отмечается его влияния на первичный и вторичный иммунные ответы или на реакции повышенной чувствительности замедленного типа; однако у крыс препарат в дозе 10 мг/кг уменьшает замедленную гиперсенситивность.

Резюме

Хлорохин модифицирует течение ревматоидного артрита, замедляя его прогрессирование без выраженных токсических реакций. Точный механизм действия препарата при РА неясен.

Однако на основании современных теорий и экспериментальных данных предполагается, что в основе его действия лежит влияние на рециклирование рецепторов и на внутриклеточный процессинг в воспалительных клетках. Главной мишенью препарата, вероятно, является макрофаг, хотя не исключается и определенное действие на нейтрофилы, фибробласты и лимфоциты.

Действие хлорохина на макрофаги скорее всего связано с изменением рН внутриклеточных органелл, следствием чего являются уменьшение образования перекисей и снижения продукции интерлейкина-1.

Т. Дж. Райзинг, Д. Б. Норрис (Т. J. Rising, D. B. Norris)

Впервые препараты золота были использованы для лечения ревматоидного артрита примерно 60 лет назад, исходя из ошибочной предпосылки о туберкулезной природе заболевания, поскольку золото угнетает рост микобактерий. Несколькоми годами позже (в 1934 г.) золото с определенным успехом стали специфически использовать для лечения РА. Однако сопутствующая интоксикация, часто наблюдаемая при лечении золотом (хризотерапия), привела к снижению его применения, что продолжалось до 60-х годов, когда вновь появился интерес к препаратам золота.

До недавнего введения в практику оральных препаратов золота (ауронофина, АФ) были доступны лишь некоторые лекарственные формы (для системного введения), содержащие натриевый тиомалат золота (НТМЗ), тиоглюкозу золота и (реже) тиопропанол-сульфат золота, которые в основном и использовались в клинике (рис. 128). Хотя связь сера-золото свойственна всем препаратам, ауронофин значительно отличается от них более высокой, чем у НТМЗ, гидрофобностью, отсутствием заряда и большей стабильностью за счет наличия двойных лигандов - серы и фосфора. Эти свойства делают ауронофин более жирорастворимым, непроводящим и потенциально менее способным к блокированию сульфгидрил-дисульфидных обменов.

Вызывает также интерес тот факт, что, несмотря на активность ряда соединений золота в экспериментальных моделях артрита, только меркаптиды золота обладают клинической антиревматической эффективностью.

Клиническая эффективность

Сегодня по-прежнему существуют разногласия в отношении использования препаратов золота при ревматоидном артрите, как и в отношении их классификации. В том, что касается классификации, противоречие здесь заключа-

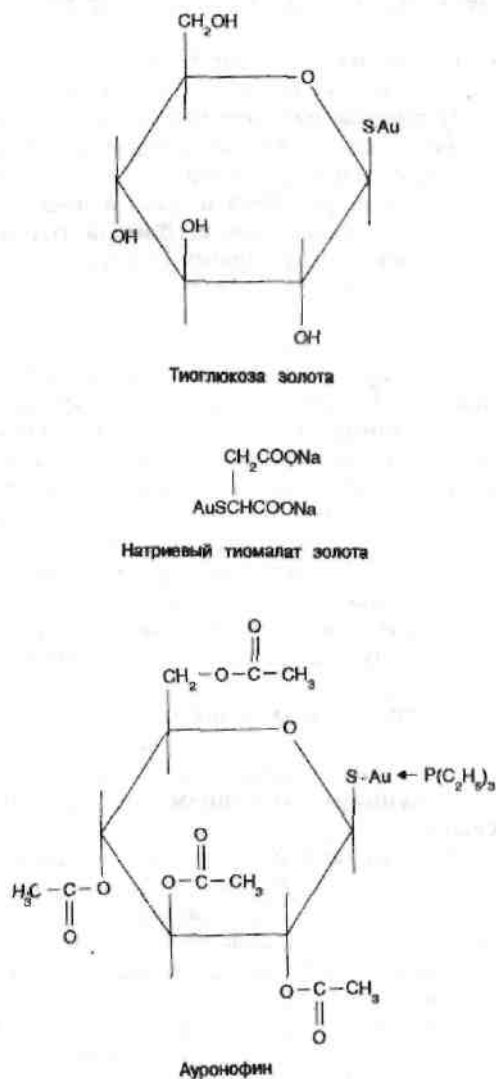


Рис. 128. Структура некоторых соединений золота, используемых при лечении артрита.

ется в определении принадлежности препаратов к той или иной группе лекарственных средств: следует ли отнести их ко второй линии (медленно действующие противоревматические препараты, МДПРП) или же к противоревматическим препаратам, модифицирующим заболевание (ПРПМЗ). Это связано с трудностью определения реальной ценности препаратов золота при лечении заболевания. Доказательства данного положения приведены ниже.

Для получения серьезных подтверждений клинической эффективности предполагаемых ПРПМЗ требуется наблюдение большого количества больных по крайней мере в течение 2 лет, а идеально и значительно дольше. Поскольку ауринофин был введен в довольно ограниченный арсенал ревматологов относительно недавно, его преимущества перед НТМЗ пока неизвестны. Тем не менее схемы применения этих препаратов совершенно различны: ауринофин назначают в дозе 3 мг 2 раза в день, тогда как НТМЗ обычно вводят внутримышечно 1 раз в неделю в возрастающих дозах, начиная с 10 мг, причем лечение продолжается несколько недель до достижения клинического улучшения или появления признаков интоксикации. Хотя время достижения максимального уровня золота в крови одинаково для НТМЗ и ауринофина, действительная концентрация после введения последнего значительно ниже и золото преимущественно связывается с белками плазмы и эритроцитами.

Обусловлена ли наблюдаемая клиническая эффективность обоих препаратов различиями в их фармакокинетическом профиле или она связана с разными механизмами действия, пока неясно.

Возможно, первой и, безусловно, одной из основных проблем оценки клинической эффективности любого ПРПМЗ, включающего золото, является подбор адекватной контрольной группы больных РА. В такой группе не должна проводиться кортикостероидная терапия, а клинические симптомы должны быть столь же выраженными, как в группе больных, получающих лечение. Не менее важной проблемой остается определение критериев оценки эффективности лечения. Вероятно, наилучшим критерием является замедление прогрессирования рентгенологических признаков заболевания суставов. На этом основании у ряда больных отмечается положительное, хотя и медленное, действие препаратов золота. Однако столь

благоприятный эффект наблюдается лишь у 20% больных РА, получавших НТМЗ длительное время. В настоящее время еще рано делать выводы об эффективности ауринофина. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии значительной разницы между этими двумя препаратами, но, по-видимому, НТМЗ вызывает замедление прогрессирования эрозий суставов в большем проценте случаев.

Механизм действия

Если хризотерапия эффективна при РА, а клинические наблюдения, как правило, подтверждают это, то каков же механизм его действия? Хотя для его выяснения за многие годы было проведено бесчисленное количество исследований и выдвинуто множество гипотез, простого ответа на этот вопрос пока нет. Однако прежде чем мы попытаемся дать какое-то новое представление об этом, необходимо рассмотреть ряд общих положений.

Во-первых, что означает клиническая эффективность, связанная с модификацией заболевания (т. е. замедлением его рентгенологическим прогрессирования) или с облегчением симптоматики? Вполне вероятно, что за эти изменения ответственны разные биологические механизмы. Во-вторых, сульфгидрильные группы в препаратах золота, обладая высокой реактивностью, должны принимать участие в осуществлении или модификации некоторых биохимических и иммунологических функций. Нельзя исключить, что эти формы активности связаны с механизмом действия препаратов у человека. В-третьих, концентрации и дозы, которые часто используются *in vitro* и у экспериментальных животных, достаточно высоки и явно превышают соответствующие сывороточные уровни золота у больных РА после введения обычных доз препарата. Однако концентрация золота на клеточных поверхностях и в активных центрах ферментов может превышать его уровень в сыворотке. Наконец, можно ли предполагать одинаковый механизм действия у ауринофина и препаратов для системного введения?

Известные данные, касающиеся механизма действия золота, приведены ниже; они могут быть разделены на три основные группы в зависимости от места их получения, а именно: 1) исследования *in vitro*; 2) эксперименты на животных; 3) клинические исследования. По-

скольку существенных различий между разными препаратами для системного введения не обнаружено, а наиболее изученным среди них является НТМЗ, это соединение будет рассматриваться как репрезентативное (т.е. им будут представлены все системные препараты золота).

Исследования in vitro

Во многих исследованиях in vitro, где использовались полиморфно-ядерные клетки, полученные у лиц без заболевания РА, было показано, что аурунофин в отличие от НТМЗ оказывает выраженное влияние на клеточные функции, связанные с фагоцитозом и хемотаксисом (табл. 39). Эффект АФ, проявляющийся подавлением фагоцитоза и хемотаксиса, зависит как от концентрации, так и от типа клеточного стимула, вызывающего выделение лизосомных ферментов (*B*-глюкуронидаза и лизоцим) и образование перекиси водорода. Подавление регистрировалось при использовании стимулов, зависимых от фагоцитов, например иммунных комплексов, тогда как в системах, независимых от фагоцитов, эффект препаратов или отсутствовал (кальциевый ионофор А23187), или был двухфазным (ЛТВ₄). В последнем случае подавление наблюдалось при концентрации АФ, эквивалентной концентрации препарата в сыворотке крови больных РА; при более низких уровнях препарата увеличивалось выделение ферментов и усиливалось образование перекисей. Активность, связанная с фагоцитами, вероятно, имеет отношение к действию АФ in vivo. Предполагают, что связывание АФ с сульфгидрилсодержащими рецепторами на поверхности ПМЯ клеток приводит к нарушению слияния лизосом с внешней мембраной, НТМЗ и АФ либо подав-

Таблица 39. Влияние АФ и НТМЗ на реакции ПМЯ

Реакция	АФ	НТМЗ
Выделение ферментов	↓ или д.эф.	X
Супероксиды	↓ или д.эф.	X или ↓ ^a
Фагоцитоз	↓	↓ ^a
Хемотаксис	↓ или X	↓ ^a

* Активен только при высоких концентрациях.

X-неактивен; д.эф. - двухфазный эффект.

Таблица 40. Влияние АФ и НТМЗ на гуморальный и клеточно-опосредованный иммунитет

Реакция	АФ	НТМЗ
Антителозависимая клеточная цитотоксичность	↑ или ↓ ^a	X
Антителозависимый и компонентзависимый лизис	↓	↑
Циркулирующие антитела	↓	↓ (слабое)
Повышенная чувствительность замедленного типа (у мышей)	↑ ^b	↑
Титр гематглютининов	X или ↓	X

^a Ингибиторное действие при концентрации 10 мкМ и стимулирующее действие при концентрации < 10 мкМ.

^b Стимулирующее действие у иммунодепрессивных (леченных метотрексатом) мышей. X-неактивен.

ляют хемотаксис ПМЯ клеток, либо не оказывают никакого действия, что также зависит от используемых стимулов.

В то время как ПМЯ являются основными клетками, участвующими в остром воспалении, макрофаги и лимфоциты играют решающую роль в иммунорегуляции хронической воспалительной реакции. На основании полученных in vitro данных предполагается, что оба препарата золота обладают эффектом, сходным с действием на ПМЯ клетки, а именно: АФ обнаруживает ингибиторную, а иногда и двухфазную активность; у НТМЗ отмечается слабая активность или полное ее отсутствие. Последнее соединение, вероятно, оказывает действие на Т- и В-клетки-помощники в результате замедления процессинга антигена, что связано с его прямым действием на аксессуарную функцию моноцитов (см. главу 6). Напротив, АФ оказывает прямое ингибиторное действие на пролиферацию Т-лимфоцитов и образование секреторных клеток, а также на супрессорные макрофаги.

Влияние АФ и НТМЗ на гуморальный и клеточно-опосредованный иммунитет в экспериментах in vitro и in vivo показано в табл. 40.

Аурунофин в отличие от НТМЗ уменьшает антителозависимый лизис под действием компонента и снижает антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ). Последняя активность определяется при концентрации 10 мкМ; при более низких концентрациях (ме-

нее 1 мкМ) отмечается стимуляция цитотоксичности. Возможно, в результате подавления АЗКЦ снижается уровень циркулирующих иммунных комплексов, что связывают с влиянием АФ на количество или качество IgG. Однако явное непостоянство подавления антителообразования показано при проведении реакции гемагглютинации, которая подавляется у крыс и не изменяется у мышей. При использовании АФ возможно как подавление, так и стимуляция иммунных ответов.

Различая острую и хроническую воспалительные реакции, необходимо ответить на вопрос: как препараты золота влияют на процессы РА, вызывающие деструкцию тканей? Данные, помогающие ответить на этот вопрос, довольно скудны, хотя был выполнен ряд экспериментов с использованием совместного культивирования тканей хряща и синовиальной оболочки. В высоких концентрациях (возможно, превышающих клинически достижимый уровень) НТМЗ подавляет распад коллагена, но не влияет на распад протеогликана. Хотя АФ и обладает подобным действием (но при более низких концентрациях), его активность связана с цитотоксичностью. Следует отметить, что в хряще большеберцовой кости у больных РА активность нейтрального металлопротеогликаназного фермента деградации (НМПФ) в 8 раз выше, чем в контроле. У больных РА, получающих комбинированное лечение НТМЗ и стероидами, обнаружена менее активная форма НМПФ.

Эксперименты на животных

Исходя из результатов экспериментов *in vitro*, можно предположить значительное ингибиторное действие АФ на модели острого воспаления у животных (вызванный каррагенаном отек лапки крыс, пассивная кожная анафилаксия, ультрафиолетовая эритема) и слабое или полное отсутствие активности у НТМЗ.

Хроническое введение золота вызывает значительное уменьшение вторичных нарушений у крыс с адьювантным артритом, причем АФ оказывается более активным, чем НТМЗ. Эта разница может быть связана с более высокой концентрацией АФ в местах поврежденных, вызванных воспалением. В то же время НТМЗ при хроническом введении дозозависимо подавляет фагоцитоз (в отличие от хемотаксиса ПМЯ клеток или нейтрофилов) и уменьшает размеры имплантируемой гранулемы.

На модели артрита (у крыс), вызванного коллагеном II типа, которая является наиболее адекватной для скрининга противоревматических препаратов, получены наиболее интересные данные о препаратах золота. В этой модели НТМЗ в отличие от АФ дает положительные результаты, заметно уменьшая отек, остеопороз, эрозию хряща и рентгенологическое прогрессирование разрушений суставов. Кроме того, НТМЗ несколько повышает уровень меди в плазме в отличие от АФ, снижающего этот показатель от 60%. Способность НТМЗ модифицировать заболевание обнаруживается при ежедневном введении препарата в течение 3 нед. Если же НТМЗ вводится один раз в неделю в течение 5 нед, то данный эффект отсутствует.

Клинические исследования

При долговременном введении АФ или НТМЗ больным РА в синовиальных клетках обнаруживаются нитеобразные отложения золота, которые персистируют в течение многих лет. Когда золото вводится в лизосомы в качестве электронно-плотных частиц, то они окружаются миелиноподобными мембранами, формируя так называемые ауросомы. Данное явление не представляется уникальным для АФ и НТМЗ, поскольку другие неактивные соединения золота, например хлораурат натрия, в эксперименте на животных также инициируют образование ауросом. Ввиду этого не представляется удивительным подавление фагоцитоза, выделения лизосомных ферментов и образования свободных радикалов ПМЯ клетками, а также угнетение хемотаксиса и фагоцитоза моноцитов, полученных у больных РА при хризотерапии. Кроме того, может наблюдаться общее снижение активности ферментов деградации. Обычно АФ более активен, чем НТМЗ, и выявляется хорошая корреляция между клеточной активностью и ремиссией заболевания. Данное наблюдение вполне предсказуемо ввиду более высокой активности АФ *in vitro* и более высоких уровней препарата в клеточных фракциях.

Однако более интересным представляется влияние соединений золота на уровни иммуноглобулинов. Исследование этих эффектов могло бы дать некоторое представление о механизме действия препаратов. Как НТМЗ, так и АФ значительно снижают концентрации IgM, IgG и IgA, причем в том же порядке, в каком они повышаются при РА; при этом НТМЗ

действует сильнее. Хотя влияние на IgA невелико, определяется более выраженное снижение уровня IgA- a_1 -антитрипсина, количество которого также значительно увеличено при РА. Образование IgA- a_1 -антитрипсина и других иммунных комплексов, связанных с повышением уровня иммуноглобулинов при РА, происходит, вероятно, за счет дисульфидных связей. Данное предположение подтверждается при определении снижения сывороточного уровня SH-групп, причем степень его уменьшения соответствует активности патологического процесса. Интересно, что при хризотерапии наблюдается значительное повышение сывороточного уровня сульфгидрильных групп. Эти данные лежат в основе гипотезы о предупреждении препаратами золота сульфгидрил-дисульфидного взаимодействия. Было бы интересно выяснить, не связано ли большее снижение уровня иммуноглобулинов под действием НТМЗ (в сравнении с АФ) с разной сульфгидрильной реактивностью этих соединений.

Еще одно важное клиническое наблюдение сделано в отношении митогениндуцированной реакции лимфоцитов, которая снижена у больных РА. НТМЗ нормализует эту реакцию, тогда как АФ вызывает ее усиление.

Резюме

Общеизвестно, что АФ обладает сильной ингибиторной активностью в отношении фагоцитарных (особенно связанных с ПМЯ клетками) функций *in vitro*. Сходная активность выявляется у НТМЗ, но только при использовании клеток от больных РА, получающих хризотерапию. Противоречие между высокой активностью АФ *in vitro* и большей клинической эффективностью НТМЗ в целом ставит вопрос о значимости острого противовоспалительного эффекта в общем механизме действия. Любое заметное улучшение в патологическом процессе наблюдается обычно не ранее чем через 3 мес, что также свидетельствует о невысоком значении фагоцитарной активности. Подобная задержка клинического улучшения больше согласуется с наблюдаемым влиянием на уровень иммуноглобулинов, которое, возможно, обусловлено действием на сульфгидрильные группы и приводит к уменьшению агрегации иммуноглобулинов и снижению образования ревматоидного фактора. И наоборот, такие изменения уровня иммуноглобулинов могут быть результатом опосредованного действия (через изменение функ-

ции макрофагов); однако золото в любом случае является иммунорегулятором.

В начале главы было выделено четыре главных вопроса, касающихся механизма действия препаратов золота при РА. Первый вопрос - о взаимосвязи клинической эффективности и биологических механизмов. Приведены аргументы в пользу существования связи между ослаблением симптоматики и влиянием на острую воспалительную реакцию, в то время как иммунорегуляторные свойства золота способствуют модификации заболевания. Во-вторых, реактивность сульфгидрильных групп АФ и НТМЗ способна влиять на биологические функции, которые, возможно, косвенно связаны с заболеванием. В-третьих, используемые *in vitro* относительно высокие концентрации золота эквивалентны его терапевтическим уровням, поскольку при РА его соединения в достаточном большом количестве аккумулируются в тканях-мишенях. И наконец, последний вопрос, касающийся различий в механизмах действия АФ и системных препаратов золота, по-прежнему остается открытым.

Побочные эффекты

Хотя хризотерапия у некоторых больных РА может привести к значительному улучшению течения заболевания, она, к сожалению, нередко сопровождается токсическими проявлениями. В целом 50% больных прекращают лечение препаратами золота в связи с появлением нежелательных эффектов. Наиболее часто наблюдаемым симптомом интоксикации, особенно при использовании НТМЗ, является пруритическая сыпь с последующей протеинурией (у 10% больных). Кроме того, при приеме ауруофина возникает диарея. Иммунные механизмы бывают ответственными за наблюдаемые побочные эффекты, хотя корреляция между терапевтическим эффектом и токсическими реакциями отсутствует. Интересно отметить, что люди с определенным гаплотипом HLA, в частности с аллелем DR_w3, более предрасположены к подобным реакциям. Возможно, протеинурия связана с образованием ауросом в почках (сходных с формирующимися в синовиальных фагоцитирующих клетках) и с последующим выделением ферментов и образованием иммунных комплексов. Меньшее значение имеют такие побочные эффекты, как нейтропения и интоксикация ЦНС.

Д. Б. Норрис, Т. Дж. Райзинг (D. B. Norris, T. J. Rising)

Впервые Р,р-диметилцистеин (рис. 129) был выделен из продуктов кислотного гидролиза пенициллина Abraham в 1943 г. и назван пеницилламином. Он представляет собой типичный продукт деградации антибиотиков пенициллинового ряда. В 1949 г. пеницилламин впервые был синтезирован химическим способом.

Пеницилламин существует либо в D-, либо в L-стереоизомерной форме, что обусловлено наличием асимметричного атома углерода. D-форма является природным изомером; аналогичная форма изомера используется в клинике. Он легко растворяется в воде. В водных растворах соединение стабильно при pH 2-4.

D-пеницилламин обладает способностью образовывать хелатные комплексы с ионами меди, и после его введения животным комплекс медь-пеницилламин выделяется с мочой. Этот медь-уремический эффект D-пеницилламина впервые был использован Walshe в 1957 г. при лечении болезни Вильсона. В настоящее время применение D-пеницилламина является обязательным компонентом лечения этого врожденного заболевания.

Walshe полагает, что D-пеницилламин может использоваться и при лечении другого врожденного заболевания - цистинурии, поскольку препарат способен разрушать сульфгидрильные связи и обмениваться с цистином с образованием более водорастворимого дисульфида пеницилламин-цистеина. Впоследствии эффективность D-пеницилламина при цистинурии была показана Crawhall и соавт. (1963).

Для лечения ревматоидного артрита D-пе-

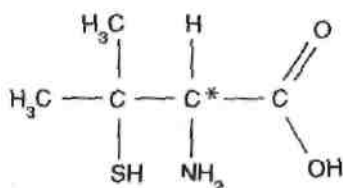


Рис. 129. Структура пеницилламина. Наличие асимметричного атома углерода (отмечено звездочкой) обуславливает существование двух стереоизомеров (D и L)

ницилламин был предложен (первоначально) в связи с его способностью расщеплять *in vitro* дисульфидные связи макроглобулинов. В 1962 г. Jape показал, что диссоциация ревматоидного фактора и, следовательно, снижение его титра в синовиальной жидкости имеет место только при введении D-пеницилламина непосредственно в коленный сустав. Этот эффект оказался временным и не ослаблял симптомов заболевания. При систематическом лечении в течение нескольких месяцев наблюдается снижение титра РФ, которое предшествует некоторому клиническому улучшению. Снижение титра РФ вряд ли обусловлено прямым действием D-пеницилламина, поскольку между началом лечения и клиническим эффектом проходит немало времени. После прекращения курса лечения возврат к исходному уровню РФ происходит не ранее чем через несколько недель.

В 1973 г. Andrews и соавт. опубликовали данные первого клинического исследования D-пеницилламина. В группе, состоящей из 52 больных, препарат вводили по 1500 мг/день (поддерживающая доза) в течение 12 мес. Контрольная группа (53 больных) получала другие виды лечения, за исключением хризотерапии, а также применения противомалярийных и цитотоксических препаратов. Обе группы были сравнимы по возрасту, полу и применению стероидов. Процент улучшения, определяемый по наличию боли, скованности в движениях (по утрам), по суставному индексу, силе сжатия, функции и скорости оседания эритроцитов, был значительно выше в группе больных, леченных D-пеницилламином. Однако 16 больных, получавших D-пеницилламин, были вынуждены прекратить лечение в связи с нежелательными побочными реакциями. Измерялись также сывороточные уровни IgG, IgM и IgA. У больных РА выявлялась (в основном в начале исследования) гипергаммаглобулинемия, а спустя 3 и 6 мес при лечении D-пеницилламином отмечалось значительное снижение сначала IgM, а затем IgG. Существенного снижения уровня IgA не наблюдалось.

В другом исследовании у больных с активным РА определялось повышенное количество циркулирующих клеток, секретировавших IgM, IgG и IgA. У больных в состоянии ремиссии (спонтанной или вызванной лечением D-пеницилламином) количество циркулирующих клеток не отличалось от контроля, за исключением IgA-секретирующих клеток, число которых оставалось повышенным.

Таким образом, D-пеницилламин, как было показано, оказывает благотворное действие при лечении трех неродственных синдромов-болезни Вильсона, цистинурии и ревматоидного артрита. В то время как биохимический механизм D-пеницилламина достаточно хорошо известен при болезни Вильсона (образование комплексов соединений меди) и при цистинурии (разрушение дисульфидных связей), его действие при РА остается неясным.

Клиническое применение

Болезнь Вильсона

Болезнь Вильсона представляет собой редкое аутосомное наследственное заболевание, характеризующееся как дегенеративными изменениями головного мозга, так и циррозом печени вследствие отложений меди. При этом заболевании выявляются снижение концентрации сывороточного церулоплазмينا и общей меди и увеличение меди, не входящей в состав церулоплазмينا.

Лечение болезни ведется в двух направлениях: уменьшение захвата и абсорбции меди; облегчение экскреции меди, уже отложившейся в тканях. D-пеницилламин предназначается для последней цели ввиду его способности образовывать хелатные комплексы с медью и таким образом увеличивать ее выведение с мочой. Начальная ежедневная доза D-пеницилламина, составляющая 1 г, может быть максимально увеличена до 2 г в день в зависимости от уровня меди в моче.

Цистинурия

Цистинурия представляет собой врожденное заболевание, при котором существует дефект транспорта аминокислот- цистина, лизина, орнитина и аргинина. Если в норме ежедневно с мочой выделяется 40-80 мг цистина, то при цистинурии его экскреция может превышать 1 г в день. При ежедневном выделении более 300 мг цистина почти обязательно происходит

образование цистиновых мочевых камней, что связано с плохой растворимостью аминокислоты в воде. Однако она легко переходит в растворимую форму при образовании смешанных дисульфидов с D-пеницилламином. Лечение заключается во введении D-пеницилламина (500-1000 мг) каждые 6 ч, причем дозы подбираются индивидуально для каждого больного так, чтобы экскреция цистина составляла примерно 100 мг в день.

Ревматоидный артрит

При лечении больных РА D-пеницилламином обычно придерживаются принципа Jaffe «иди низко, иди медленно», чтобы свести к минимуму нежелательные медикаментозные эффекты. Установленная начальная доза 250 мг в день увеличивается с тремя месячными интервалами на 250 мг. Если через 3 мес не отмечается улучшения и нет признаков серьезных нежелательных реакций на дозы 500-750 мг/день, то дозу можно увеличивать до получения ремиссии или возникновения интоксикации. Однако превышение суточной дозы 1500 мг считается необычным. Хотя оптимальная продолжительность лечения не определена, ремиссия обычно достигается в течение 6 мес, после чего дозу постепенно снижают на 250 мг с тремя месячными интервалами. Частота и выраженность нежелательных реакций на D-пеницилламин уменьшается при его постепенном назначении и при использовании низких поддерживающих доз.

Биохимические эффекты D-пеницилламина

Многие биохимические эффекты D-пеницилламина определяются его способностью образовывать комплексы с ионами меди и разрушать дисульфидные связи.

Комплексы D-пеницилламин-медь обладают перекисной дисмутазной активностью, т. е. они способны инактивировать свободные кислородные радикалы, образующиеся при дыхательном взрыве фагоцитирующих клеток (см. главу 3). Ранее показано, что перекисные ионы и другие свободные радикалы принимают участие в поддержании хронического воспаления, а также инициируют и поддерживают аутоиммунные реакции при РА. Перекисная дисмутаза, осуществляющая защиту от перекисных радикалов, в синовиальной жид-

кости не определяется. Поскольку стимулированные ПМЯЛ генерируют перекисные радикалы со скоростью до $10 \text{ нмоль}/10^6$ клеток в минуту и типично обнаруживаются в синовиальной жидкости в концентрации 10^7 клеток/мл, они представляют собой потенциально большой источник повреждающих свободных радикалов кислорода. Таким образом, постулированный механизм действия D-пеницилламина при РА - его активность в качестве перекисной дйсмутазы.

В недавних исследованиях установлено, что D-пеницилламин способен влиять на иммунный ответ. В экспериментах *in vitro* D-пеницилламин в присутствии меди подавляет пролиферацию, индуцированную митогенами. Это действие связано с Т-помощниками и Т-суп-рессорами, тогда как В-клетки остаются ин-тактными. Подавление отменяется каталазой, что свидетельствует о прямом или косвенном участии перекиси водорода. Значение подавления пролиферации Т-клеток неясно, поскольку количество и функции Т- и В-лимфоцитов у больных РА, леченных D-пеницилламином, не изменяется. Однако безлимфоцитарные сульфиданты, полученные при обработке лимфоцитов больных РА, леченных D-пеницилламином и при последующей инкубации лимфоцитов с D-пеницилламином *in vitro*, значительно уменьшают образование коллагена-зы культивируемыми синовиальными клетками. Сам по себе D-пеницилламин не нарушает продукции коллагеназы синовиальными клетками, что предполагает косвенное (опосредованное лимфоцитами) действие препарата.

D-пеницилламин также образует комплексы с фосфатом пиридоксаля, что приводит к антагонизму с витамином В₆. Так как фосфат пиридоксаля необходим для поддержания иммунного ответа, то иммунодепрессивная активность препарата может объясняться антагонизмом. Однако другие препараты с антивитаминой (против В₆) активностью неэффективны при лечении РА. Кроме того, многие ферменты организма (особенно переносящие аминокислоты) зависят от фосфата пиридоксаля в качестве кофактора и поэтому также угнетаются D-пеницилламином. Однако прямых доказательств фармакологической активности D-пеницилламина, которая не была бы связана с образованием комплексов с данным фактором, пока нет.

D-пеницилламин дозозависимо индуцирует патологические сшивки коллагена. Для объяснения этой активности постулированы два ме-

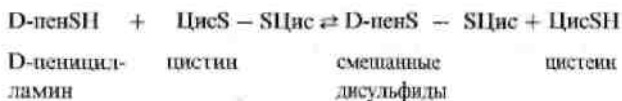
ханизма. Во-первых, D-пеницилламин, образуя хелатные соединения с медью, может подавлять лизил-оксидазу (медьсодержащая оксидаза), которая катализирует окислительное дезаминирование ε-аминогрупп некоторых лизильных и оксизильных остатков. В норме реакция приводит к образованию реактивных альдегидов, необходимых для образования меж- и внутримолекулярных перекрестных связей в молекуле коллагена. Однако если *in vitro* легко получить высокие концентрации D-пеницилламина, которые необходимы для подавления фермента, то *in vivo*, вероятно, они не достигаются. Во-вторых (более вероятно), подавление *in vivo* достигается в результате образования умеренно стабильных комплексов между D-пеницилламином и предшественниками реактивных альдегидов, необходимых для формирования связей в коллагеновой молекуле. Это приводит к повреждению связей и сопутствующему увеличению растворимого коллагена. Поскольку D-пеницилламином повреждается только коллаген I типа (обнаруженный в коже), а коллаген костей, ревматоидного синовия, кровеносных сосудов и желудочно-кишечного тракта резистентен к препарату, подобная активность, вероятно, не может играть важной роли в общем механизме действия D-пеницилламина при РА.

Влияние на тиоловые группы

Тиоловый статус больных РА значительно отличается от нормального контроля. Наряду с понижением уровня тиола в плазме нарушается тиоловая активность альбумина. Поскольку D-пеницилламин вызывает повышение сывороточного тиола у больных РА, предполагается наличие связи между терапевтическим эффектом препарата при РА и его влиянием на тиоловую систему. Подтверждение этой гипотезы получено при определении уровня внутриклеточного глутатиона. Глутатион играет важную роль в сохранении стабильности лизосомных и других клеточных мембран. Кроме того, он участвует в защите от повреждений перекисями и другими свободными радикалами, а также обладает противовоспалительным действием, связанным с угнетением перекисного окисления липидов и синтеза простагландинов. У больных с хорошим ответом на D-пеницилламин уровень глутатиона эритроцитов повышается через 2-8 нед после начала лечения, причем его повышение прогнозирует

клинический ответ несколькими неделями позже. Увеличение глутатиона отчасти может быть связано с прямым действием препарата, высвобождающего свободный глутатион из смешанных дисульфидов. Однако при инкубации D-пеницилламина с эритроцитами *in vitro* повышения уровня глутатиона не наблюдается.

D-пеницилламин *in vitro* вызывает деполимеризацию высокомолекулярного макроглобулина, вероятно, вследствие сульфгидрил-дисульфидного обмена, ведущего к образованию смешанных пеницилламино-белковых дисульфидов с меньшей молекулярной массой. Способность D-пеницилламина разрушать макроглобулин послужила предпосылкой к проведению клинического исследования препарата при синдроме Вальденстрема (макроглобулинемия). Хотя D-пеницилламин *in vitro* вызывает деполимеризацию сывороточных макроглобулинов, высокие уровни препарата, необходимые для возникновения этого эффекта *in vivo*, труднодостижимы. D-пеницилламин может обмениваться со свободным цистином, образуя смешанные дисульфиды пеницилламин-цистин:



Эта реакция представляет модель действия препарата при цистинурии, а поскольку смешанные дисульфиды обладают большей водорастворимостью, чем цистин, возможность возникновения цистиновых камней уменьшается.

Действие препарата в экспериментальных моделях артрита

Не существует общепризнанных экспериментальных моделей ревматоидного артрита. Имеющиеся модели воспаления, которые отвечают на нестероидные противовоспалительные препараты, нечувствительны к D-пеницилламину; это модели полиартрита, индуцированного адьювантом, воспаления, вызванного каррагенаном, реакции Артюса, отека крысиной лапки, который вызван каррагенаном, и артрита (у крыс), индуцированного коллагеном II типа.

Однако D-пеницилламин обладает активностью, способствующей уменьшению антиген-

индуцированного артрита у кроликов (модель Glynn - Dumonde). В этой модели кроликов подкожно иммунизируют овалбумином с последующим введением разрешающей дозы антигена в коленный сустав. Введение в течение 210 дней D-пеницилламина в дозе 15 мг/кг, которая эквивалентна дозе 1 г/день для 70-килограммового больного, вызывает уменьшение отека сустава.

При исследовании после забоя было обнаружено менее значительное поражение сустава, которое определялось по эрозии кости и хряща и интенсивности воспаления синовиальной оболочки у животных, получавших лечение D-пеницилламином (по сравнению с контролем). Эффект был особенно заметным, когда лечение препаратом начиналось за 10 нед до иммунизации. Предположительно он связан с подавлением клеточно-опосредованного ответа на антиген или со стимуляцией фагоцитарной активности; однако не исключается и комбинированный эффект.

Показано, что D-пеницилламин влияет на процесс разрушения хряща в воздушном пузыре у мышей. В этой модели аутологичный мечевидный отросток имплантируют в воздушный пузырь, воспаление которого вызвано каррагенаном. D-пеницилламин вводят в дозе 50 мг/кг. Через 7 дней выделяют мечевидный отросток, в котором определяют содержание протеогликанов. Их концентрация у животных, получающих лечение препаратом, гораздо выше, чем у нелеченых мышей, что свидетельствует о способности D-пеницилламина предотвращать распад хряща. Противовоспалительной активности препарата при этом не выявлено, поскольку общее число воспалительных клеток незначительно отличается от контроля.

Таким образом, D-пеницилламин проявляет активность в двух экспериментальных моделях: в одной из них он замедляет деградацию имплантированного хряща, в другой предупреждает поражение сустава при экспериментальном моноартрите. Подавление последующих повреждений сустава представляется необходимым этапом лечения, если D-пеницилламин обладает модифицирующим влиянием на РА.

Показано, что D-пеницилламин *in vivo* и *in vitro* обладает рядом биохимических эффектов. Неизвестно, имеет ли какой-либо из этих эффектов отношение к механизму действия препарата при РА. Многие из эффектов D-пеницилламина *in vitro* определяются при концентрациях препарата, труднодостижимых *in vivo*.

Таблица 41. Активность D-пеницилламина

In vivo	In vitro
Угнетение/супрессия	Угнетение/супрессия
Ревматоидный фактор	Митогенез лимфоцитов
Уровень иммуноглобулинов	Уровень супероксидных ионов
Иммуноглобулинсекретирующие клетки	Концентрация макроглобулинов
Связи коллагена	Антагонизм с витамином В ₆
Образование коллагеназы	Хемотаксис ПМЯ
Стимуляция	Стимуляция
Образование хелатных комплексов с медью	Образование Н ₂ О ₂
Макрофагальный фагоцитоз	Макрофагальный фагоцитоз
Уровень тиолов	
Уровень глутатиона	

Например, мало вероятно, что способность D-пеницилламина вызывать деполимеризацию макроглобулинов *in vitro* и снижать уровень макроглобулинов *in vivo* опосредуется одним и тем же механизмом.

В настоящее время эффективность D-пеницилламина при лечении РА является хорошо установленным фактом. Механизм его действия представляется совокупностью различных эффектов, а не одиночным эффектом (табл. 41).

Побочные эффекты

Токсические реакции на D-пеницилламин наблюдаются довольно часто, в связи с чем в 35-50% случаев препарат приходится отменять. При РА частота побочных реакций выше, чем при болезни Вильсона или цистинурии. Токсичность D-пеницилламина может быть связана как с метаболическими (сульфоксидация), так и с независимыми генетическими факторами. Хотя связь токсичности D-пеницилламина с антигенной детерминантой HLA-DR3 не подтверждена, больные с нарушением сульфоксидации или HLA-DR3-позитивные относятся к группе высокого риска.

Уменьшение нежелательных реакций на D-пеницилламин (как по частоте, так и по интенсивности) достигается при соблюдении режима дозирования «иди низко, иди медленно». Большинство побочных эффектов наблюдается в первые 18 мес и мало вероятно, что основные нежелательные реакции возникнут вскоре после этого периода.

Гемопозитические ткани

Гематологические побочные эффекты представляются наиболее серьезными из нежелательных реакций, вызываемых D-пеницилламином. Среди них отмечаются лейкопения, тромбоцитопения и апластическая анемия, причем наиболее часто наблюдаемым осложнением является тромбоцитопения.

Протеинурия

Протеинурия отмечается более чем у 30% больных РА, леченных D-пеницилламином, и только у 4% больных с синдромом Вильсона. При биопсии почек обнаруживается типичный нефрит с иммунными комплексами. Максимальная частота осложнения приходится на 6-9-й месяц после начала лечения. При ежедневной экскреции белка с мочой свыше 2 г лечение должно быть прекращено. Нормализация почечной функции происходит в течение 12 мес.

Кожные реакции

Кожная сыпь относится к наиболее часто наблюдаемым побочным реакциям и может возникать уже через 2 нед лечения. При болезни Вильсона сыпь встречается чаще, чем при РА, что связано с более высокой начальной дозой препарата. «Поздняя» кожная сыпь наблюдается через несколько месяцев (или даже лет) после лечения; обычно она нечувствительна к антигистаминным препаратам, и при ее возникновении требуется отмена лечения. У 1% больных развиваются язвы полости рта, что требует снижения дозы или (гораздо чаще) отмены препарата.

Нарушение вкуса

Нарушение вкуса относится к весьма частым побочным эффектам препарата. Обычно оно возникает в первые несколько недель и сохраняется до 3 мес. Осложнение проходит даже при продолжении лечения.

Аутоиммунные синдромы

Сообщается, до D-пеницилламин может участвовать в развитии красной волчанки, миастении гравис, полимиозита, дерматомиозита и пузырчатки. Хотя некоторые из этих сообщений были исключительными, D-пеницилламин должен отменяться при возникновении симптоматики, напоминающей любой из указанных синдромов.

Заключение

Хотя прошло уже почти 30 лет с тех пор, как D-пеницилламин был впервые применен в качестве лекарственного препарата для лечения болезни Вильсона и сегодня он хорошо известен как медикаментозное средство, применяемое при ревматоидном артрите, механизм его действия все еще недостаточно ясен. Лечение D-пеницилламином представляется альтернативой хризотерапии, и, хотя осложнения при этом возникают довольно часто, они легко контролируются снижением дозы или отменой препарата. Как и при лечении солями золота, здесь необходим постоянный контроль, в частности регулярное проведение анализов периферической крови и мочи. D-пеницилламин относится к медленнодействующим препаратам, его терапевтические эффекты могут проявляться лишь через несколько месяцев. Поэтому лечение должно продолжаться не менее 6-12 мес, прежде чем оно будет признано неэффективным.

Резюме части 4

ДЖ.К.ФОРМЕН (J.C. FOREMAN)

Последний раздел книги посвящен влиянию препаратов на иммунные реакции, и в заключение необходимо сделать некоторые обобщения. Нашей целью является не подробное описание препаратов, используемых в клинике при иммунных и воспалительных заболеваниях, а рассмотрение механизмов фармакологического воздействия на иммунную систему с помощью доступных в настоящее время лекарственных средств.

Исследование механизмов действия препаратов на иммунную систему требует адекватных моделей; здесь описаны и обсуждены некоторые из них. Совершенно очевидно, что проведение иммунофармакологических исследований затрудняется отсутствием удобных моделей для определения эффективности пре-

паратов. Например, отсутствуют хорошие модели ревматоидного артрита и астмы.

При иммунологических и воспалительных процессах определен ряд возможных областей медикаментозного вмешательства.

1. Предупреждение избыточного поступления патогенного организма или антигена.

2. Модуляция процессинга антигена иммунной системой.

3. Усиление или подавление функции T-клеток в зависимости от той роли, которую они играют в заболевании.

4. Модификация B-клеточного ответа и антителообразования.

5. Модификация связывания антител или изменение их действия.

6. Вмешательство в реакцию антиген-антитело.

7. Подавление действия эффекторных клеток, включая супрессию образования и выделения медиаторов.

8. Подавление действия медиаторов на ткани-мишени.

Не все примеры механизмов действия препаратов доступны в настоящее время, но, насколько возможно, они были показаны в части 4 данной книги. В некоторых случаях читателю следует обратить внимание на предварительные исследования соединений с другими механизмами действия, которые обсуждаются в предыдущих разделах книги.

Стероидные и нестероидные противовоспалительные средства являются яркими образцами лекарственных препаратов, изменяющих выделение медиаторов. Для многих других препаратов, описанных в части 4, не установлено единого механизма действия, поэтому здесь приведены некоторые гипотезы, которые могут объяснить их терапевтический эффект. В частности, это относится к препаратам золота, пеницилламину, хлорохину и хромогли-кату.

Новым направлением представляется использование цитокинов для лечения иммунных заболеваний, что показано в главе, посвященной интерлейкину-2. Успехи молекулярной биологии позволяют с помощью технологии рекомбинантной ДНК получать аналогичные интерлейкину-2 вещества в количествах, необходимых для их клинического применения. Судьба этого нового подхода вызывает немалый интерес, особенно в свете разочарований в интерфероне, на терапевтическую ценность которого после этого открытия возлагались очень большие надежды.